

**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A. C.**

**METABOLITOS VOLÁTILES EMITIDOS POR FRUTOS  
DE TOMATE INFECTADO POR *Alternaria* COMO  
INDICADORES DE INFECCIÓN EN ESTADOS  
TEMPRANOS DE DESARROLLO**

---

Por:

David Armando Encinas Basurto

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

Hermosillo, Sonora

Septiembre 2014

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis del I.B. David Armando Encinas Basurto, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



---

Dra. Rosalba Troncoso Rojas  
Director de tesis



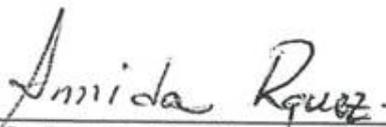
---

Dr. Martín Tiznado Hernández  
Asesor



---

Dra. Ana Isabel Valenzuela Quintanar  
Asesor



---

M.C. Armida Rodríguez Félix  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director de tesis del manuscrito en cuestión.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de posgrado

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD)** por permitirme realizar mis estudios de maestría, por prestarme sus instalaciones, y así poder alcanzar una meta importante en mi formación.

A la **Coordinación de Tecnologías de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV)** y a todos sus investigadores, técnicos y alumnos que de una u otra manera me ayudaron para realizar mi proyecto de investigación.

Un especial agradecimiento a mi directora de tesis, **Dra. Rosalba Troncoso Rojas**, que me brindó todo su apoyo, confianza y conocimientos para la realización de este trabajo, además de paciencia y dedicación.

A los miembros del comité: **Dr. Martín Ernesto Tiznado Hernández**, **Dra. Ana Isabel Valenzuela Quintanar** y **M.C. Armida Rodríguez Félix**, gracias por sus comentarios, sugerencias y apoyo durante estos dos años.

Al **Dr. Aaron Fernando González Cordova** y a la **M.C. Carmen Estrada**, gracias por prestarme sus instalaciones y por todo su apoyo técnico al igual que a **M.C. Jorgito Mercado** y **M.C. Alberto Sanchez** equipo necesario para la realización de mi trabajo de tesis.

Al departamento de **Docencia y Posgrado** por todos sus servicios y apoyos otorgados. Así como a todos mis **maestros docentes** que ayudaron en mi formación de maestro en ciencias.

A la **Dra. Joan W. Bennett** de la Universidad de Rutgers en New Jersey, Estados Unidos, por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio.

## DEDICATORIA

Primeramente este trabajo de dos años lleno de nuevas experiencias, quiero dedicar y agradecer a mi familia, a mi papa que siempre estuviste apoyándome, a mi hermana Judith gracias por no solo ayudarme en gran manera a concluir el desarrollo de esta tesis, sino por esos momentos que pasamos en new jersey, a Jessica mi hermanita que sabes que te apoyare y cuentas conmigo en todo☺.

A dos personas muy importantes que formaron parte de mi vida e hicieron la persona que soy ahora, a mi madre y abuelo que en paz descansen, siempre pensando en ustedes y son una inspiración para mí.

También en este tiempo conocí a una persona muy importante en mi vida que siempre estuvo conmigo en las buenas y en las malas, ya sea para disfrutar conmigo esos momentos de felicidad o para alentarme en esos días de desaliento cuando algo no salía bien en los experimentos o exposiciones, a mi novia Thalía, mi compañera durante todo este proceso y para toda la vida☺.

A mis compañeros de vegetales: Heri, Gaby, Cinthia, Dalila, Rosy etc..que hicieron más amena estos dos años y en general a toda el área de la CTAOV que de alguna forma contribuyeron en este trabajo.

A mis amigos ongi, valen, pancho, roby, roy, perro, memo, gordo, banas, tocho etc. son muchos y no terminaría también gracias : D

## CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUCCION.....	1

2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Generalidades de Tomate .....	3
2.1.1 Producción de Tomate.....	3
2.1.2 Manejo Poscosecha .....	5
2.2 Enfermedades Poscosecha del Tomate .....	7
2.2.1 Enfermedad Poscosecha Causada por <i>Alternaria alternata</i> .....	8
2.3 Detección de Enfermedades Poscosecha .....	12
2.4 Mecanismo de Defensa Natural en Plantas/Frutos .....	13
2.5 Metabolismo Secundario .....	14
2.6 Metabolitos Volátiles.....	15
2.6.1 Metabolitos Volátiles en Tomate.....	18
2.6.2 Metabolitos Volátiles Emitidos por Hongos.....	25
2.6.3 Volátiles Emitidos como Respuesta al Estrés Biótico .....	26
2.6.4 ¿El Perfil de Volátiles Inducido es Específico a un Determinado Patógeno? .....	32
3. HIPOTESIS .....	35
4. OBJETIVOS .....	36
4.1 Objetivo General.....	36
4.2 Objetivos Específicos .....	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
5.1 Selección del Material Vegetal .....	37
5.2 Preparación de Cultivos de <i>A. alternata</i> .....	37
5.3 Preparación del Inóculo .....	38
5.4 Inoculación de Frutos de Tomate .....	38
5.5 Detección de Metabolitos Volátiles por Cromatografía de Gases.....	39
5.5.1 Optimización del Método de Detección de Metabolitos Volátiles Libres .....	39
5.5.2 Metabolitos Volátiles Emitidos por <i>Alternaria alternata</i> Bajo Condiciones <i>In Vitro</i> .....	39
5.5.3 Metabolitos Volátiles Emitidos por Tomate Sano e Infectado con <i>A. alternata</i> .....	41
5.5.4 Precisión del Método Cromatográfico.....	41
5.6 Determinación del Inicio y Desarrollo de la Infección en Tomate Causada por <i>A. alternata</i> .....	42
5.7 Diseño de Experimentos.....	42
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	44

6.1 Optimización del Método de Detección de Metabolitos Volátiles Libres de Tomate.....	44
6.1.1 Selección de la Fibra en MEFS .....	44
6.1.2 Tiempos de Adsorción de la Fibra CAR/PDMS .....	46
6.1.3 Precisión del Método Cromatográfico para la Detección de Metabolitos Volátiles Libres .....	48
6.2 Metabolitos Volátiles Emitidos por <i>Alternaria alternata</i> bajo Condiciones <i>In Vitro</i> .....	48
6.3 Metabolitos Volátiles Libres Emitidos por Tomate Sano e Inoculado con <i>Alternaria</i> .....	54
6.3.1 Metabolitos Volátiles Emitidos por Frutos Sanos.....	55
6.3.2 Metabolitos Volátiles Libres Emitidos por Frutos de Tomate Infectados por <i>A. alternata</i> .....	59
6.3.3 Efecto de la Temperatura en la Emisión de Metabolitos Volátiles en Frutos de Tomate .....	64
6.4 Determinación del Inicio y Desarrollo de la Infección por <i>A. alternata</i> ..	73
7. CONCLUSIONES.....	78
8. REFERENCIAS .....	79

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Conidios de <i>A. alternata</i> con 1 a 9 septos transversales y varios longitudinales u oblicuos.....	9
2. Frutos de tomate infectados con el hongo <i>Alternaria alternata</i> .....	11
3. Factores que afectan la emisión de volátiles.....	16
4. Rutas biosintéticas involucradas en la síntesis de	

metabolitos volátiles. DOXP: 1-Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato...	21
5. Área total de metabolitos volátiles libres detectados en frutos de tomate por cromatografía de gases y adsorbidos con diferentes fibras utilizadas en la microextracción en fase sólida. Las barras de error indican el error estándar de la media ( $n = 3$ ).....	45
6. Área total de los metabolitos volátiles libres emitidos por frutos de tomate, adsorbidos con la fibra Polidimetilsiloxano/Carboxen a diferentes tiempos de adsorción y detectados por CG. Las barras de error indican el error estándar de la media ( $n = 3$ ).....	47
7. Cromatograma de una mezcla de estándares obtenido por microextracción en fase sólida con una fibra de Polidimetilsiloxano/Carboxen y cromatografía de gases (CV: coeficiente de variación).....	49
8. Metabolitos volátiles libres detectados en <i>A. alternata</i> por cromatografía de gases acoplado a un detector de masas y microextracción en fase sólida con la fibra Polidimetilsiloxano/Carboxen: a) medio PDA; b) medio PDA inoculado con una cepa de <i>Alternaria alternata</i> después de 10 días de incubación. 1A) Patrones de fragmentación de la muestra (estireno), 1B) Patrones de fragmentación del estireno de la biblioteca NIST 2011. 2A) Patrones de fragmentación de la muestra (azuleno), 2B) Patrones de fragmentación del azuleno de la biblioteca NIST 2011.....	50
9. Metabolitos volátiles libres detectados por cromatografía de gases acoplado a un detector de masas y microextracción en fase sólida con la fibra Polidimetilsiloxano/Carboxen en fruto de tomate sano a las 48 horas de almacenamiento a 20°C. 1A) Patrones de fragmentación de la muestra (etanol), 1B) Patrones de fragmentación del etanol de la biblioteca NIST 2011. 2A) Patrones de fragmentación de la muestra (3-metil, 1-butanol), 2B) Patrones de fragmentación del 3-metil, 1-butanol de la biblioteca NIST 2011.....	56

10.	Metabolitos volátiles detectados por cromatografía de gases acoplado a un detector de masas y microextracción en fase sólida con la fibra Polidimetilsiloxano/Carboxen en frutos de tomate infectados con <i>A. alternata</i> , 48 horas de almacenamiento a 20°C. 1A) Patrones de fragmentación de la muestra (3-metil,1-butenal), 1B) Patrones de fragmentación del 3-metil, 1-butenal de la biblioteca NIST 2011. 2A) Patrones de fragmentación de la muestra (1-butanol), 2B) Patrones de fragmentación del 1-butanol de la biblioteca NIST 2011.....	60
11.	Comportamiento de metabolitos volátiles libres en frutos de tomate sin inocular a diferentes temperaturas (15 y 20°C) y tiempos de muestreo, adsorbidos mediante microextracción en fase sólida utilizando la fibra Polidimetilsiloxano/Carboxen y detectados por cromatografía de gases. Las barras significan la desviación estándar entre las muestras ( $n = 3$ ). .....	65
12.	Metabolitos volátiles libres detectados por cromatografía de gases y microextracción en fase sólida en fruto de tomate sano, a las 48 horas de almacenamiento, a las temperaturas de a) 15°C y b) 20°C.....	67
13.	Comportamiento de los metabolitos volátiles: estireno, tolueno, acetato de 2-metil,1-butanol, 3-metil, 2-butenal, 3-metil,1-butanol y etanol, emitidos por frutos infectados a las diferentes temperaturas y a los distintos tiempos de muestreo ( $n=4$ ).....	68
14.	Comportamiento de los metabolitos volátiles: 4-metil, 1-pentanol, 6-metil-5-hepten-1-ona, 1-butanol y 2-metil,1-butanol, emitidos por frutos infectados a las diferentes temperaturas y a los distintos tiempos de muestreo ( $n=4$ ).....	69
15.	Desarrollo de la infección por <i>A. alternata</i> en frutos de tomate. a) 96 hpi, 15°C, b) 144 hpi, 15°C, c) 72 hpi, 20°C, d) 144 hpi, 20°C.....	75

16.	Lesión causada por <i>Alternaria alternata</i> en fruto de tomate en las primeras etapas de la enfermedad (Observación con Estereoscopio Leica MZ6).....	76
-----	--	----

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1.	Producción mundial de tomate en 2012 (en millones de toneladas).....	4
2.	Temperatura de almacenamiento de acuerdo al grado de madurez del tomate.....	6

3.	Correlación entre metabolitos volátiles responsables del sabor en tomate.....	19
4.	Estructuras, funciones y olores de metabolitos volátiles comunes emitidos por hongos.....	27
5.	Metabolitos volátiles emitidos en mayor concentración por hojas de tomate inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> .....	29
6.	Metabolitos volátiles detectados en frutos de arándano inoculados con tres géneros diferentes de hongos.....	31
7.	Metabolitos volátiles emitidos por <i>Alternaria alternata</i> a los 10 días de crecimiento en medio de cultivo PDA.....	52
8.	Metabolitos volátiles detectados en frutos de tomate sano a 20°C.....	58
9.	Metabolitos volátiles detectados en frutos de tomate infectado y almacenado a 20°C, 48 horas post-inoculación...	62

## RESUMEN

El tomate es una de las principales hortalizas que se produce y exporta en México. Debido a su fisiología y alto contenido de agua es altamente perecedero y susceptible a podredumbres causadas por fitopatógenos como *Alternaria alternata*, el cual produce pérdidas postcosecha. Las enfermedades son detectadas una vez que los síntomas son visibles en el fruto y ya es demasiado tarde para controlarlas, por lo que surge el interés de contar con

métodos alternativos para la detección temprana del patógeno antes del desarrollo de la enfermedad. Se ha reportado que tanto los frutos como los microorganismos, así como durante el proceso de infección, éstos emiten metabolitos volátiles (MV) los cuales pueden ser utilizados como indicadores de la enfermedad o de la presencia del patógeno. En este trabajo se evaluaron cambios en el perfil de MV en tomates sanos e infectados por *Alternaria alternata* con el fin de evaluar la posibilidad de utilizarlos para la detección temprana de la infección, así como también metabolitos volátiles liberados por el hongo. Se inocularon frutos de tomate con esporas de *A. alternata* y tomates no inoculados fueron utilizados como testigo. Los frutos se mantuvieron a 15 y 20°C por 48 horas. Se tomó una muestra del espacio de cabeza mediante la técnica de cromatografía de gases y microextracción en fase sólida (CG-MEFS), a las 0, 3, 6, 9, 12, 24, y 48 horas post-inoculación. Adicionalmente se determinaron los MV emitidos por *A. alternata*. Los metabolitos volátiles se analizaron mediante un cromatógrafo de gases utilizando estándares comerciales y un detector de masas cuadrupolo para su identificación. Los MV emitidos por *A. alternata* fueron: tolueno, etilbenceno, azuleno, entre otros. En frutos sanos los principales metabolitos identificados fueron 3-metil,1-butanol, 6-metil-5-hepten-1-ona, hexanal, etanol, entre otros. En frutos infectados se detectaron hasta 14 metabolitos volátiles, entre éstos se detectaron emitidos por *A. alternata*, así como también MV diferentes a los emitidos por tomate sano lo que sugiere que son derivados de la interacción tomate-*Alternaria*, como: 3-metil,2-butenal, acetato de 2-metil,1-butenol, estireno, azuleno; 1-hexanol; 2-metil-1-butenol; entre otros. Se observaron cambios en el perfil de volátiles del tomate sano con respecto al inoculado desde las 3 horas post-inoculación (hpi). Los MV emitidos por frutos almacenados a 20°C presentaron mayor intensidad con respecto a los emitidos a 15°C. El número de metabolitos detectados a 20°C fue mayor a 15 °C. La detección de los metabolitos volátiles por CG-MEFS puede ser una técnica útil en la detección temprana de enfermedades causadas por *Alternaria alternata* en poscosecha de frutos de tomate.

Palabras clave: tomate, metabolitos volátiles, detección temprana, *Alternaria alternata*

## **ABSTRACT**

Tomato is a major vegetable that is produced and exported in Mexico. Its physiology and high water content make this fruit highly perishable and susceptible to decay caused by pathogens such as *Alternaria alternata*, which reduces postharvest quality and marketing. The diseases are detected once the symptoms are visible in the fruit and it is too late to control it, so there is an interest of seeking an alternative technique for early detection of the pathogen before disease development is visible. It has been reported that both the fruit as

microorganisms and during the infection process, they emit volatile compounds (VM) which may be indicative of disease or presence of the pathogen. In this study we evaluated changes in the VC profile in healthy and infected fruits by *Alternaria alternata* under storage and marketing temperature, for early detection of infection on tomatoes. Tomato fruits were inoculated with *A. alternata* spores, no inoculated fruit was considered as control. The fruits were kept at 15 and 20°C for 48 hours. A sample of the headspace was taken by solid phase microextraction (SPME) technique, at different times: 0, 3, 6, 9, 12, 24, and 48 hours after inoculation. In addition, volatile compounds emitted by *A. alternata* were detected. The compounds were analyzed through a gas chromatograph using commercial standards and a quadrupole mass detector for identification. Some volatile compounds emitted by *A. alternata* were identified as: toluene, ethyl benzene, azulene, among others. In healthy fruit, the main volatile compounds identified were: 1-butanol,3-methyl, 5-hepten-1-ona,6-methyl, hexanal, ethanol, among others. In tomato infected with the pathogen, the number of volatile compounds detected was higher than that detected in healthy fruit. Some of these compounds were detected previously on emissions by *A. alternata*, as well as compounds derived from tomato-*Alternaria* interaction, which were not detected in healthy fruits. Such compounds were identified as: 3-methyl,2-butenal, ethyl,2-methyl, 1-butenol, styrene, azulene, 1-hexane, 2-methyl,1-butenol, among others. Changes in the VM profile detected in inoculated fruits with respect healthy fruit were observed since 3 h after inoculation process. The VM profile in fruits stored at 20°C showed higher intensity compared to those stored at 15°C. The number of compounds detected at 20°C was greatest than at 15°C. Detection of volatile compounds by GC-SPME can be a useful technique in the early detection of diseases in postharvest tomato fruit caused by *Alternaria alternata*.

Keywords: tomato, volatile metabolite, early detection, *Alternaria alternata*



## 1. INTRODUCCION

El tomate es una de las principales hortalizas que se produce y exporta en México. Sus características sensoriales y nutricionales convierten al tomate en un alimento muy aceptado por el consumidor. Sin embargo, por ser un fruto climatérico, el tomate es muy sensible al manejo y condiciones de almacenamiento inapropiados, lo cual trae como consecuencia una reducción en la vida poscosecha (FAO, 2007). La comercialización del tomate se ve afectada por el desarrollo de podredumbres causadas por *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl, o por *Botrytis cinerea* Pers:Fr principalmente (Jones, 2001).

En términos generales, las enfermedades se detectan una vez que los síntomas son evidentes en el fruto. Estas son verificadas mediante técnicas como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), basado en proteínas producidas por el patógeno. Otra técnica es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Prithiviraj et al., 2004; Li et al., 2006; Ruiz-Ruiz et al., 2009). Sin embargo, estas técnicas no distinguen entre un microorganismo vivo o no, por lo que es importante desarrollar una técnica rápida, sencilla y altamente sensible que permita la detección del fitopatógeno en el fruto entero previo al desarrollo de síntomas característicos de enfermedad. Esto apoyará en el control de las pérdidas causadas por fitopatógenos (Sankaran et al., 2010)

Una de las áreas recientes del conocimiento que más desarrollo ha presentado en los últimos tiempos es la ecología química, la cual se encarga de estudiar las interacciones bióticas mediadas por sustancias químicas (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007). Entre estas sustancias, los metabolitos secundarios (MS) volátiles desempeñan un papel significativo y han sido objeto de exhaus-

tivos estudios por su gran número de aplicaciones en las industrias farmacológica, agrícola, entre otras (Knudsen et al., 1993).

La emisión de MS volátiles durante la interacción planta-patógeno ha sido previamente publicada, sin embargo, hay un número limitado de estudios en los cuales el perfil de los MS volátiles emitidos por frutos infectados con patógenos, ha sido reportado diferente a aquel producido por frutos sanos (Cardoza et al., 2002; Jansen et al., 2009; Li et al., 2010; Hussaini et al., 2011). Esta medición de MV liberados por frutos infectados podrían ser indicadores de la presencia del patógeno y puede ser fácilmente integrado en prácticas agrícolas como un monitoreo rápido, fiable y en tiempo real de enfermedades de frutos para el control y manejo de la enfermedad. La detección temprana de enfermedades del fruto (antes de la aparición de síntomas de la enfermedad) puede ser una fuente valiosa de información para la ejecución de las estrategias de manejo de plagas adecuados y medidas de control de enfermedades para evitar el desarrollo y la propagación de enfermedades

Más aún, la información científica publicada sobre el perfil de los metabolitos volátiles emitidos por frutos de tomate infectados por patógenos es escasa. Por lo anterior, la detección de los MS volátiles puede ser una técnica alternativa para la detección temprana de la infección en frutos de tomate antes del desarrollo de los síntomas característicos de la enfermedad.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de Tomate

#### 2.1.1 Producción de Tomate

El tomate rojo, o también conocido como “jitomate” (*Solanum lycopersicum*), es una de las hortalizas con mayor dinamismo y su producción va en ascenso a nivel mundial. China ocupa el número uno en producción de tomate a nivel mundial (Lucier, 2011), mientras que México se encuentra en el décimo lugar (**cuadro 1**) y en el año 2011, México ocupó el primer lugar en exportación del fruto con más de 1 millón de toneladas (FAOSTAT, 2014). Su principal mercado es Norteamérica (Estados Unidos y Canadá), al cual se destina el 95% de sus exportaciones. La producción mexicana de tomate ha progresado regularmente durante el siglo XX y se ha incrementado considerablemente en las tres últimas décadas. En el 2012 se logró una producción de poco más de tres millones de toneladas (FAOSTAT, 2014).

**Cuadro 1.** Producción mundial de tomate en 2012 (en millones de toneladas).

<b>Posición</b>	<b>Región</b>	<b>Producción (T)</b>
1	China	50,000,000
2	India	17,500,000
3	Estados Unidos	13,206,950
4	Turquía	11,350,000
5	Egipto	8,625,219
6	Irán (República Islámica)	6,000,000
7	Italia	5,131,977
8	España	4,007,000
9	Brasil	3,873,985
10	México	3,433,567

Fuente: FAO, 2014

### 2.1.2 Manejo Poscosecha

La cosecha del fruto se efectúa en distintos grados de maduración según el mercado al que se destina, las condiciones de transporte y la temperatura. El tomate destinado a proceso debe cosecharse en estado rojo maduro y para el consumo en fresco se cosecha en diversos grados de maduración (Mahovic et al., 2002). El tomate es un fruto que se comercializa en forma rápida, debido en parte a que su vida útil es de una semana a temperatura ambiente. La temperatura recomendada para su almacenamiento depende de su grado de madurez y de su sensibilidad al daño por frío. Se recomiendan temperaturas de 12.5-15°C para frutos en estado de madurez verde maduro, 10-12 °C para frutos en estado rojo claro y 7-10°C para el fruto maduro firme (**cuadro 2**). Si los frutos de tomate son almacenados por debajo de sus temperaturas óptimas, éstos podrán sufrir daño por frío. Este desorden se presenta como lesiones en la superficie del fruto, haciéndolo más susceptible al desarrollo de enfermedades como pudriciones, especialmente la causada por el hongo *Alternaria* spp. (Mahovic et al., 2002).

Durante la maduración y según su comportamiento respiratorio, los frutos se clasifican en climatéricos y no climatéricos. Los frutos no climatéricos, tales como los cítricos, cereza y fresa, no manifiestan cambios importantes en la respiración; mientras que los denominados climatéricos, entre los que se encuentran la manzana, plátano, aguacate y tomate, experimentan un incremento característico de la misma. Al iniciarse la maduración, la respiración aumenta hasta alcanzar una producción máxima para descender posteriormente. Durante la maduración del tomate se producen cambios importantes en el color, composición, aroma, y textura. Dentro de estos cambios ocurre la síntesis de licopeno que imparte al fruto el color rojo y la degradación de clorofila, síntesis de ácidos orgánicos, azúcares y volátiles característicos del aroma para los diferentes estados de madurez, así como una disminución de firmeza del epicarpio, que hacen al fruto atractivo para el consumo humano. La

**Cuadro 2.** Temperatura de almacenamiento de acuerdo al grado de madurez del tomate.

Estado de madurez	Rango de temperatura	Vida de almacenamiento
Verde maduro	12.5 – 15°C	14 días
Rojo claro	10 – 12°C	8 a 10 días
Maduro firme	7 – 10°C	3 a 5 días

fracción volátil del tomate está constituida por más de 400 metabolitos, entre las que se encuentran hidrocarburos, ésteres, fenoles, aldehídos, alcoholes, cetonas, aminas y moléculas heterocíclicas, los cuales aumentan durante la maduración del fruto (Tandon et al., 2003).

El deterioro de los frutos es generalmente ocasionado por patógenos oportunistas, los cuales no pueden infectar directamente los tejidos de los frutos a menos que los tejidos sufran algún tipo de daño. Los daños mecánicos (por ejemplo, daño por presión o golpes, cortes, pinchazos, entre otros) que ocurren durante la cosecha y el manejo después del corte, son una causa importante para el desarrollo de infecciones debido a que representan vías de entrada para los patógenos (Mahovic et al., 2002; Kalia y Gupta, 2006; Corbo et al., 2010).

## 2.2 Enfermedades Poscosecha del Tomate

Las enfermedades constituyen uno de los factores que limitan la producción de tomate en muchas partes del mundo, sobre todo cuando no se utilizan cultivares con resistencia a varias de ellas. Existen cerca de 200 enfermedades del tomate de diversas causas y etiologías, para cuyo control se utilizan cultivares resistentes, así como medidas de exclusión, erradicación y protección en el contexto de un programa de control integrado (Jones, 2001).

La enfermedad es una alteración fisiológica que sufre una planta o fruto susceptible cuando es atacado por un agente abiótico o por un organismo patógeno en un ambiente favorable (Tamayo Molano y Jaramillo Noreña, 2006). Entre los patógenos que causan enfermedades en la poscosecha de tomate se encuentran los hongos: *Geotrichum candidum*, responsable de la pudrición ácida; *Rhizopus stolonifer*, el cual provoca formaciones llenas de agua y exudación de líquido. También destaca la presencia de *Alternaria alternata*, causando la pudrición de moho negro (Herzog et al., 1998; Espinoza et al.,

2012; Martínez et al., 2012). Este último es de particular importancia debido a que infecta a los frutos de tomate bajo condiciones de almacenamiento y comercialización.

### **2.2.1 Enfermedad Poscosecha Causada por *Alternaria alternata***

El hongo *Alternaria alternata* infecta a los frutos maduros, los síntomas varían desde pequeñas lesiones superficiales de color café claro hasta lesiones necróticas hundidas. En condiciones de alta humedad, el hongo produce una capa negra de conidios sobre el tejido infectado (Félix-Gastélum y Gálvez-Figueroa, 2002). Los conidios de *Alternaria* tienen septos transversales y longitudinales y se les conoce como dictiosporas de color pardo. Nacen por la brotación apical de una célula conidiógena o de la espora anterior, dando lugar en este último caso a una cadena que suele ramificarse si una espora produce más de un brote. El hongo *A. alternata* produce cadenas de 10 o más conidios muy ramificadas a partir de conidióforos cortos (Carrillo, 2003). La ramificación de los conidios surge de conidióforos secundarios desde células conidiales basales o apicales, en relación 1:1, dando un aspecto abierto (Andersen et al., 2001). Las cadenas aparecen en los cultivos como manojos densos y aislados. En la **figura 1** se muestran los conidios de *A. alternata* (Roberts et al., 2000).

Cuando la incidencia de *A. alternata* supera el 8% de un lote de frutos, ésta pierde su calidad para exportación, lo que representa pérdidas significativas para el productor. En ocasiones, la incidencia de la enfermedad supera este porcentaje aun cuando los productores previamente desechan el fruto infectado antes de su envío para exportación. Esta enfermedad es altamente incidente en el Norte de Sinaloa y su severidad varía de acuerdo a las condiciones de humedad prevalentes durante la madurez de los frutos y al retraso en la cosecha (Félix-Gastélum y Gálvez-Figueroa, 2002). La esporulación de *Alternaria* es óptima a 27°C pero es inhibida por debajo de



**Figura 1.** Conidios de *A. alternata* con 1 a 9 septos transversales y varios longitudinales u oblicuos (Roberts et al., 2000).

15°C o por sobre 33°C, aunque el rango de crecimiento de este hongo está entre 0 y 35°C. La actividad de agua mínima para el desarrollo de este hongo es 0.88 y la óptima casi 1.00%. El crecimiento se reduce a la mitad en una atmósfera con más de 15% CO<sub>2</sub> o con 2.8% O<sub>2</sub> (Carrillo, 2003).

Cuando ocurren períodos prolongados de follaje mojado debido a rocíos, lluvia o alta humedad relativa, los conidios del hongo germinan en respuesta a nutrientes solubles presentes en la superficie de los frutos invadiendo hasta un 50% de ellos como puede observarse en la **figura 2**. Todas las variedades de tomate destinados a la industria que se usan actualmente son susceptibles a la enfermedad, de ahí la importancia del uso de los fungicidas para su control. Los productores de tomate que abastecen la industria del norte del Sinaloa comúnmente realizan 1 ó 2 aplicaciones de los fungicidas comerciales Clorotalonil o Mancozeb para el control de moho negro del fruto, y en muchas ocasiones estas resultan ineficaces debido a que se realizan cuando ya se observan los síntomas iniciales de la enfermedad (Félix-Gastélum y Gálvez-Figueroa, 2002).

Bajo condiciones naturales, los frutos interactúan con un gran número de microorganismos potencialmente patogénicos. Sin embargo, los frutos o plantas normalmente permanecen sanos, debido en parte a la manifestación de varios mecanismos de defensa. Como parásitos, los fitopatógenos están obligados a obtener los nutrimentos de fuentes existentes y para ello necesitan invadir y adaptarse al tejido del hospedante para eventualmente reproducirse. Además, necesitan evadir o contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta. Aquellos patógenos capaces de desarrollarse y reproducirse solo en tejidos de hospedantes vivos son llamados biótropos. Otro tipo de patógenos, denominados necrótrofos, como lo es *Alternaria alternata* producen la muerte de las células hospedantes obteniendo de esta forma los nutrimentos a partir del tejido muerto. En este grupo se incluyen la mayoría de los hongos y las bacterias fitopatógenas.



**Figura 2.** Frutos de tomate infectados con el hongo *Alternaria alternata* (Snowdon, 2010).

## 2.3 Detección de Enfermedades Poscosecha

Las enfermedades de las plantas y frutos son ocasionadas por microorganismos infecciosos como los hongos y son el producto de la interacción dinámica entre un patógeno, un hospedante y el medio ambiente. Existen varios procedimientos para determinar la etiología de enfermedades en plantas/frutos tales como, la observación directa del agente causante al microscopio compuesto, técnicas inmuno-enzimáticas, bioquímicas y moleculares, y microscopía electrónica. El diagnóstico es el fundamento técnico y científico para adoptar medidas de manejo rápido y oportuno (Guzmán-Piedrahita et al., 2009).

La detección de las enfermedades en plantas y frutos se realiza en primer lugar, mediante un diagnóstico o inspección visual que puede realizarse en el mismo sitio donde crece la planta, o bien, donde son almacenados y/o comercializados los frutos. Este diagnóstico se basa en los síntomas visuales que son característicos de enfermedades específicas. Si el patógeno en observación es identificado con manuales especializados, o cuando los postulados de Koch son demostrados, el patógeno aislado es el responsable de la enfermedad (Guzmán-Piedrahita et al., 2009)

La enfermedad es verificada mediante técnicas como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), basado en proteínas producidas por el patógeno. Otra técnica es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se basa en secuencias del ácido desoxirribonucleico (ADN) del patógeno (Prithiviraj et al., 2004; Li et al., 2006; Ruiz-Ruiz et al., 2009). La PCR es rápida, económica y permite producir un gran número de copias de moléculas de ADN vía catálisis enzimática, para mostrar diferencias en secuencias de genes del ARN ribosomal (rARN) o ADN mitocondrial (mADN) (Atkins y Clark, 2004). Sin embargo, estas técnicas no distinguen entre un microorganismo vivo o no, por lo que es importante contar con una técnica rápida, sencilla y altamente

sensible que permita la detección del fitopatógeno activo en el fruto entero previo al desarrollo de síntomas característicos de la enfermedad. Una posible técnica puede ser la detección de metabolitos volátiles del fruto que pueden ser emitidos como un mecanismo de defensa contra el estrés biótico, o bien, pueden ser emitidos por el patógeno durante la interacción fruto-patógeno.

## 2.4 Mecanismo de Defensa Natural en Plantas/Frutos

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico (Jiménez et al., 2004). Para defenderse del daño ocasionado por el ataque por herbívoros o por microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de estos, o tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano, también la composición y la estructura de la pared celular vegetal cambian, formando una barrera más rígida y menos digerible para herbívoros (Croteau et al., 2000). Estas respuestas de defensa a su vez, participan en combinación con el desarrollo de estructuras contra sus depredadores, tales como los tricomas y los pelos glandulares. Así mismo y como parte de la protección química, otra estrategia utilizada por las plantas es la producción de metabolitos secundarios (MS) con actividad antimicrobiana (Croteau et al., 2000).

Los MS tienen gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos. Además, la síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas, como: a) consumo por herbívoros, b) el ataque por microorganismos, como virus, bacterias y hongos, c) competencia por el espacio de suelo, luz y

los nutrientes entre las diferentes especies de plantas, y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abióticos (Blancard, 2011).

## 2.5 Metabolismo Secundario

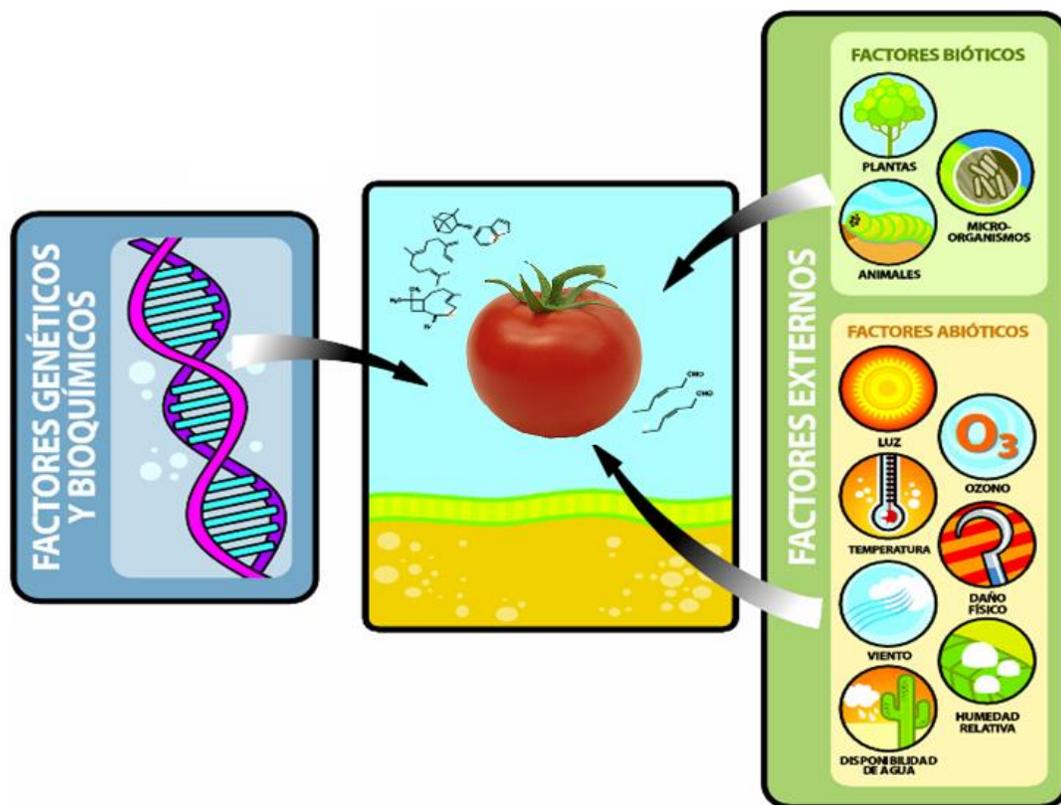
El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía es utilizada para biosíntesis de moléculas comunes en todas las células y que son necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y se denominan metabolitos primarios (Avalos-García y Pérez-Urria, 2011). El metabolismo secundario se puede definir como la biosíntesis, la transformación y la degradación de los metabolitos endógenos mediante enzimas especializadas, las cuales se han formado como resultado de los procesos de diferenciación y se clasifican según su significado biológico y función en la célula productora (Makkar et al., 2007).

Los MS son de gran importancia ecológica porque participan como potentes antimicrobianos y antioxidantes, también contribuyen al olor, color y sabor del fruto. Uno de los fenómenos importantes que ocurren en las plantas es la liberación del carbono asimilado en la fotosíntesis en forma de metabolitos o metabolitos volátiles (MV) orgánicos. Se estima que la emisión de volátiles, que es un proceso que sucede en casi todas las plantas, ocupa entre el 10 y 36% del carbono asimilado dependiendo de la especie de planta (Peñuelas y Llusà, 2004; Maffei et al., 2011). El estudio de la emisión de los volátiles permite entender las interacciones entre las plantas emisoras y los organismos receptores, y como éstos después de recibir la señal pueden modificar su comportamiento, fisiología y sus interacciones con otros organismos (Bautista-Lozada et al., 2012).

## 2.6 Metabolitos Volátiles

Las plantas normalmente liberan agua y pequeñas cantidades de sustancias químicas volátiles cuando sus estomas están abiertos, las cuales se difunden a la atmósfera (Macías-Sámano, 2001). Hasta ahora, se han descrito más de 1700 metabolitos volátiles a partir de especies pertenecientes a más de 90 familias (Maffei et al., 2011). Los metabolitos volátiles son producidos y emitidos por hojas, frutos, flores y raíces, pero se liberan principalmente a través de la superficie de la hoja y sitios de almacenamiento en las hojas (Paré y Tumlinson, 1999). Las plantas de algodón (*Gossypium hirsutum*), por ejemplo, poseen glándulas en las cuales los volátiles son almacenados (Turlings y Wäckers, 2004), mientras que en las plantas de papa (*Solanum tuberosum*) son almacenados en los tricomas (Agelopoulos et al., 2000).

Las tasas de emisión de volátiles de plantas están influenciadas en mayor o menor grado por una gran cantidad de factores que pueden alterar ya sea la síntesis o la presión de vapor de estos. Los factores que afectan los volátiles pueden ser: a) genéticos y bioquímicos, y b) externos, subdividido a su vez en bióticos y abióticos (**figura 3**). Los del primer grupo determinan la producción y emisión de volátiles porque regulan los niveles de las enzimas responsables de los pasos finales en la biosíntesis y la disponibilidad del sustrato en la célula, y hacen que las emisiones sean altamente específicas y regidas por el desarrollo de la planta. Generalmente ocurre una mayor emisión de volátiles, en los estadios tempranos de maduración de frutos, en flores antes de la polinización, y en las hojas jóvenes, entre otros (Dudareva et al., 2004), debido a los cambios enzimáticos y aumento de sustratos disponibles como ácidos grasos, carotenoides y aminoácidos.



**Figura 3.** Factores que afectan la emisión de volátiles (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007).

Las plantas difieren cualitativa y cuantitativamente en la composición de volátiles que liberan. Las diferencias cualitativas se observan principalmente entre distintas especies y, en menor proporción, entre variedades de la misma especie de planta (Bautista-Lozada et al., 2012). Por ejemplo, en plantas de aguacate (*Persea americana*) la variedad Hass no emite volátiles de manera perceptible, aunque posee los metabolitos en sus hojas; mientras que en la variedad Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*) si hay emisión de volátiles (Bravo-Monzón y Espinosa-García, 2008). Entre genotipos de una misma especie también hay variación en la emisión de volátiles, que pueden ser diferencias cualitativas y cuantitativas (Bravo-Monzón y Espinosa-García, 2008). Si bien el tipo y cantidad de volátiles emitidos están sujetos a control genético, pueden ocurrir cambios durante el desarrollo de la planta como efecto de cualquier señal ambiental (Agelopoulos et al., 2000).

Los volátiles se pueden clasificar como compuestos primarios o libres, y secundarios o conjugados. Los primeros compuestos están presentes en tejido del fruto intacto, y los secundarios son producidos como resultado de la hidrólisis de los conjugados. Estos últimos compuestos, son aquellos unidos a azúcares como glucósidos o glucosinolatos. Los compuestos enlazados glicosídicamente en los tejidos de las frutas son principalmente O- $\beta$ -D-glucósidos y O-diglicósidos, aunque los triglicósidos también se han identificado (Sarry y Günata, 2004). Algunos compuestos como el guayacol, eugenol, salicilato de metilo que están glicosilados, dan lugar a la formación de un diglicósido durante el desarrollo del fruto. Posteriormente, las glucosidasas endógenas rompen el enlace glicosídico provocando la liberación de una aglicona (parte unida al azúcar) volátil (Ortiz-Serrano y Gil, 2007). Las agliconas pueden ser liberados del azúcar durante la maduración, el procesamiento y el almacenamiento, o por la acción de enzimas, ácidos o de calor (Reineccius, 2004). Los compuestos volátiles libres son a menudo liberados después de una ruptura celular cuando enzimas y sustratos entran en contacto (Baldwin, 2002). La proporción de los compuestos volátiles glicosilados son por lo general mayor que la de los volátiles libres (Rambla et al., 2014).

Se ha demostrado la utilidad de los MS volátiles en la defensa, protección, polinización y comunicación de las plantas (Paré y Tumlinson, 1999; Baldwin et al., 2006; Vickers et al., 2009; Zangerl y Berenbaum, 2009). Los metabolitos volátiles (MV) emitidos por plantas generalmente son mezclas complejas de muchos metabolitos orgánicos que representan pequeñas cantidades respecto al peso total de la planta. También son conocidos también como aceites esenciales, aceites volátiles o esencias. Por lo general son sustancias altamente lipofílicas de bajo peso molecular, cuya volatilidad se debe a que se evaporan al ser expuestos al aire o a temperatura ambiente, por lo que sus presiones de vapor son altas (Dudareva et al., 2004).

Estos metabolitos son producidos por muchas especies vegetales, además de musgo, hongos y bacterias (Fernando y Nawalage, 2011). Su producción ocurre en las mismas rutas biosintéticas de metabolitos secundarios no volátiles, lo que explica su diversidad. Los terpenos son los MV más abundantes, seguidos de los derivados de ácido grasos (hidrocarburos saturados e insaturados), bencenoides y fenilpropanoides, aunque también se han reportado sustancias azufradas y nitrogenadas (Dudareva et al., 2004).

### **2.6.1 Metabolitos Volátiles en Tomate**

En el fruto de tomate se han identificado más de 400 metabolitos volátiles, de los cuales sólo 30 presentan concentraciones por encima de una parte por billón (ppb); de éstos, sólo unos cuantos metabolitos contribuyen mayormente a la percepción del aroma (**cuadro 3**) (Beaudry, 2000), pero es difícil relacionar el aroma del tomate con un compuesto en específico.

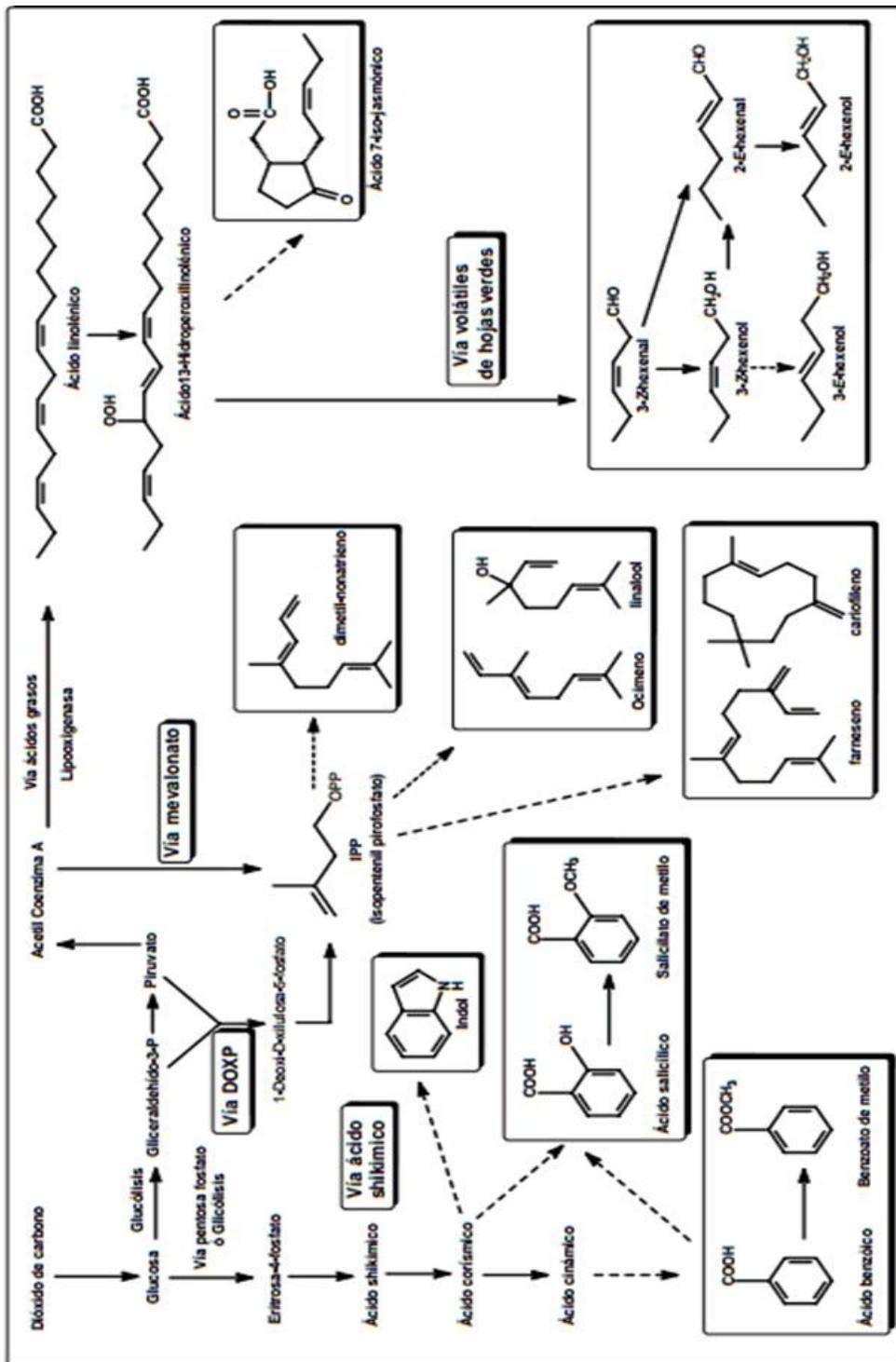
**Cuadro 3.** Correlación entre metabolitos volátiles y el sabor en tomate.

Descripción	Volátil de referencia	Referencia bibliográfica
Dulce	Acetona, 2-isobutiltiazol, metanol, trans-2-heptanal, 6-metil-5-hepten-2-ona.	(Abegaz et al., 2004)
Ácido	Acetona, $\beta$ -ionona, metanol, hexanal, trans-2-heptanal, geranilacetona	(Abegaz et al., 2004)
Hierba	Hexanal, 1-nitro-2-feniletano, $\beta$ -ionona, geranilacetona	(Berna et al., 2005)
Tomate	Cis-3-hexanal, hexanal, geranilacetona	(Abegaz et al., 2004)
Tomate verde	(E)-2-hexenal, metanol, trans-2-heptanal	(Berna et al., 2005)
Rancio	3-Metilbutanol, 1-penten-3-ona	(Berna et al., 2005)
Floral	2-Feniletanol	(Berna et al., 2005)
Frutal	3-Metilbutanol, 1-penten-3-ona	(Abegaz et al., 2004)
Pungencia	2-Isobutiltiazol, 1-penten-3-ona, 6-metil-5-hepten-2-ona, trans-2-heptanal	(Abegaz et al., 2004)
Astringencia	Acetona, hexanal, 6-metil-5-hepten-2-ona	(Abegaz et al., 2004)
Metálico	1-penten-3-ona	(Abegaz et al., 2004)

La producción de volátiles es afectada por condiciones celulares como: disponibilidad de sustratos y enzimas, ubicación de las reacciones, propiedades físicas de los sustratos y actividad de las enzimas (Schwab et al., 2008). La composición y concentración de los metabolitos volátiles puede intensificar la percepción del sabor del tomate o contribuir a la formación de sabores desagradables. Estas concentraciones pueden variar según la variedad, el estado de madurez, el periodo de almacenamiento y los tratamientos poscosecha (Krumbein et al., 2004).

La biosíntesis de los metabolitos volátiles abarca rutas bioquímicas que involucran diferentes enzimas y sustratos, donde los ácidos grasos, aminoácidos libres y carotenoides son los principales precursores (Tieman et al., 2007). Entre las rutas biosintéticas de mayor importancia en la producción de los metabolitos volátiles en plantas, se encuentran: la ruta de los ácidos grasos/lipoxigenasa, la ruta del mevalonato/no mevalonato que da origen a los terpenos, y la ruta del ácido siquímico/triptófano (**Figura 4**) (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007; Tieman et al., 2007).

**2.6.1.1 Ruta de la lipoxigenasa (LOX).** En las células eucariotas operan fundamentalmente cuatro sistemas enzimáticos para la modificación oxidativa de los ácidos grasos:  $\alpha$ -oxidación,  $\beta$ -oxidación, co-oxidación y ruta de la lipoxigenasa (LOX). En general, se puede decir que los tres primeros carecen de una especificidad de sustrato, mientras que el sistema LOX presenta una clara especificidad, siendo exclusivo para ácidos grasos poliinsaturados con estructura Z,Z-1,4-pentadieno (Sanz et al., 1992). Las principales enzimas que participan en este sistema son la LOX, hidroperóxido-liasa (HPL) y alcohol deshidrogenasa (ADH), siendo la LOX la primera enzima involucrada en la producción de volátiles a partir de ácidos grasos.



**Figura 4.** Rutas biosintéticas involucradas en la síntesis de metabolitos volátiles. DOXP: 1-Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato.

Evidencias experimentales han revelado un incremento lineal en la actividad de la LOX durante la maduración de los frutos de tomate, cuya actividad máxima ocurre en el estado cambiante (cambio de color verde a rojo) del fruto, y luego disminuye en el estado maduro. A nivel celular la actividad de la LOX en frutos de tomate se ha reportado tanto en los diferentes organelos de una célula como en la parte soluble, y su mayor actividad se lleva a cabo entre la epidermis y el mesocarpio del fruto (Yilmaz, 2001).

La ruta biosintética de los ácidos grasos/lipoxigenasa es la responsable de la producción de los metabolitos volátiles C<sub>6</sub> o también conocidos como volátiles de hojas verdes como hexanal, hexenol y la cetona (Z) jasmona entre otros (Rodríguez-Saona, 2012). Estos metabolitos volátiles se forman a partir de los ácidos grasos poli-insaturados, el ácido linoléico y el ácido linolénico. Ambos ácidos son componentes importantes de las membranas celulares de las plantas, y son oxidados por la enzima lipoxigenasa cuando éstos son liberados por el daño mecánico en las hojas. En el proceso de conversión a los metabolitos volátiles C<sub>6</sub>, el ácido linolénico es oxidado al ácido 9- o 13-hidroperoxilínolénico o una mezcla de los dos. Estos son posteriormente fragmentados por la enzima hidroperóxido liasa para formar dos metabolitos: uno de seis carbonos (Z-3-hexenal) y otro de 12 carbonos (el ácido 12-oxo-Z-9-dodecanóico). Después de una serie de re-ordenamientos, reducciones, y/o esterificaciones, éstos producen los metabolitos volátiles C<sub>6</sub>: (Z)-3-hexenal, (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexenol, y acetato de (Z)-3-hexenilo. Los metabolitos C<sub>6</sub> son típicamente liberados inmediatamente como una respuesta rápida al daño mecánico en las plantas (Turlings y Wäckers, 2004).

Debido a que la vía de oxidación de lípidos consiste en una secuencia de enzimas (lipasa, LOX, HPL, isomerasa, alcohol deshidrogenasa (ADH), como reportaron Turlings y Wäckers (2004), se espera que haya diferentes tasas de producción de metabolitos volátiles en función del número de pasos enzimáticos necesarios y de la actividad de las enzimas específicas (Christensen et al., 2007). En frutos de tomate, los primeros metabolitos volátiles formados por la

acción de la HPL son los aldehídos hexanal y (Z)-3-hexenal, derivados de los ácidos linoléico y linolénico, respectivamente. La enzima isomerasa puede convertir el aldehído (Z)-3-hexenal a (E)-2-hexenal, y ambos pueden ser convertidos a los correspondientes alcoholes por la enzima ADH (Brauss et al., 1998). Los alcoholes generados por la actividad de la ADH son sustratos naturales para la formación de ésteres, por la acción de la enzima alcohol aciltransferasa (AAT) que forman: hexil, (2,E)-hexenil y (Z,3)-hexenil éster (Salas, 2004).

**2.6.1.2 Ruta del mevalonato/no mevalonato.** Los terpenos representan una de las clases más grandes de metabolitos secundarios (Breitmaier, 2006), con una gran diversidad de estructuras químicas (lineales, cíclicas, policíclicas) y con diferentes grupos funcionales como hidroxilos, carbonilos, cetonas, aldehídos y/o con grupos peróxido. Estos metabolitos, también llamados isoprenoides, son encontrados en plantas como constituyentes de sus aceites esenciales (McCaskill y Croteau, 1997) y cumplen funciones como hormonas (giberelinas), pigmentos fotosintéticos (fitol, carotenoides), o transportadores de electrones (ubiquinonas), y en algunos casos pueden actuar como atrayentes de polinizadores o como repelentes de cierto tipo de insectos (Kessler y Baldwin, 2001; Pichersky y Gershenzon, 2002). La mayoría de los terpenos conocidos se deriva de estas vías, y los más comunes son homoterpenos (p. e., iononas, 6-metil-5-hepten-2-ona, geranil acetona), monoterpenos (p. e., linalol, limoneno, miriceno, trans  $\beta$ -ocimeno), sesquiterpenos ( $\alpha$ -farneseno, nerolidol, cariofileno) y diterpenos (cembreno, fitol) (Knudsen et al., 1993), aunque los diterpenos se encuentran en menor proporción debido a su baja volatilidad (Loughrin et al., 1990). Los precursores de todos ellos son el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dimetil-alil difosfato (DMAPP), y según el sitio de síntesis dan origen a monoterpenos o a sesquiterpenos. Así, si el IPP proviene del ácido mevalónico, su síntesis ocurre principalmente en el citosol, para que luego dos moléculas de IPP se condensan con una de dimetil-alil-difosfato

(DMAPP) y formen el farnesil difosfato (FPP), el cual es precursor de todos los sesquiterpenos (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007). Caso diferente ocurre con los monoterpenos, en los cuales el IPP es sintetizado a través de la ruta del no mevalonato, 1-desoxi-D-xilosa-5-fosfato (DOXP), en los cloroplastos, donde se transforma en su isómero DMAPP, y por la condensación de una molécula de IPP con una de DMAPP se genera el geranyl pirofosfato (GPP), precursor universal de los monoterpenos (McCaskill y Croteau, 1998).

Algunas enzimas importantes en la producción de los MS volátiles tipo terpeno son: hidroximetil-glutaril coenzima A reductasa (HMGC<sub>o</sub>AR), que es clave en la biosíntesis del mevalonato, y las terpeno sintetasas (TS), familia de enzimas que cataliza la conversión de los intermediarios de la vía de los terpenos [dimetil alil difosfato (C<sub>5</sub>), geranyl difosfato (GPP C<sub>10</sub>), farnesil difosfato (FPP C<sub>15</sub>), geranylgeranyl difosfato (C<sub>20</sub>)] en hemi, mono, sesqui, y diterpenos, respectivamente (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007). Casi todos los productos de hemi, mono y sesqui sintetasas son volátiles a temperatura ambiente y presión atmosférica, y se encuentran como componentes de las flores (Shimada et al., 2005).

Evidencias experimentales indican que los metabolitos volátiles 6-metil-5-hepten-2-ona, geranyl acetona, y farnesil acetona, son resultado de la oxidación de carotenoides acíclicos; mientras que  $\alpha$ -ionona,  $\beta$ -ionona y  $\beta$ -damascenona, son productos probables del rompimiento oxidativo de los carotenoides cíclicos y otros terpenoides glucosidados que pueden existir en el tejido vegetal (Canoles et al., 2005). En tomate, el principal carotenoide es el licopeno, responsable del color rojo. Los principales MV derivados de este carotenoide son: 6-metil-5-hepten-2-ona, 6-metil-5-hepten-2-ol y geranyl acetona (Caris-Veyrat et al., 2003), los cuales se ha reportado que se incrementan durante la maduración del fruto de tomate (Gao et al., 2008).

**2.6.1.3 Ruta del ácido siquímico/triptófano.** Esta ruta es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los metabolitos fenólicos de plantas. A partir de eritrosa-4-P y del ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido siquímico y, derivados de éste, así como los aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptófano y tirosina. El primer paso en la biosíntesis de estos metabolitos es el que lleva a cabo la fenilalanina-amonio liasa (PAL), al desaminar la fenilalanina para generar el ácido cinámico (AC). Luego sigue la eliminación de dos carbonos de la cadena, usando al AC como precursor. Para esto se han propuesto dos rutas; la vía  $\beta$ -oxidación dependiente de CoA, análoga a la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, y la vía alterna independiente de CoA, no  $\beta$ -oxidativa (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007). Esta ruta da origen también al salicilato de metilo, el cual es producido vía síntesis del ácido salicílico.

El metabolismo de los aminoácidos también genera metabolitos alifáticos, alcoholes ramificados, aldehídos, cetonas, ácidos y ésteres. La biosíntesis de estos volátiles involucra principalmente tres enzimas: aminotransferasa, descaboxilasa y ADH, síntesis en la que el aminoácido leucina es convertido a 3-metilbutanol y 3-metilbutanal (Tieman et al., 2007). El indol, un compuesto volátil que contiene nitrógeno, es producido por la ruta del triptófano y es su intermediario en la síntesis de este aminoácido (Rodríguez-Saona, 2012).

## **2.6.2 Metabolitos Volátiles Emitidos por Hongos**

Aproximadamente 250 MV han sido identificados a partir de hongos, los cuales se producen como mezclas de hidrocarburos simples, aldehídos, cetonas, alcoholes, fenoles, tioésteres y sus derivados, incluyendo, entre otros, los derivados del benceno, y ciclohexanos (Korpi et al., 2009). Los metabolitos volátiles emitidos por hongos se derivan de las vías de metabolismo primario y secundario, (**cuadro 4**). Estos metabolitos se pueden difundir a través de la

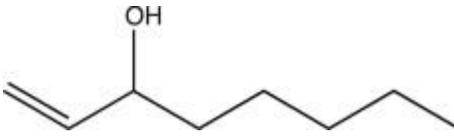
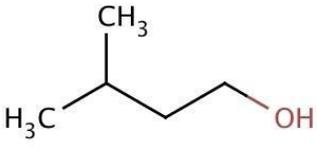
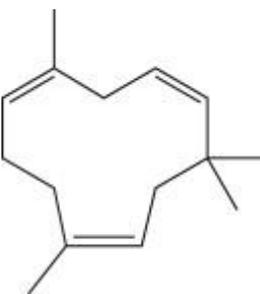
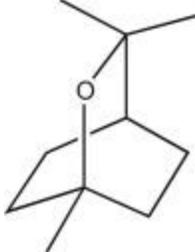
atmósfera y el suelo, por lo que pueden servir como indicadores de la presencia de estos.

Algunos ecologistas han reportado el papel de muchos metabolitos orgánicos volátiles fúngicos como semioquímicos que funcionan como atrayentes y elementos de disuasión a los insectos y otros invertebrados. En la agricultura, los MV de hongos se han utilizado como parte de las estrategias de control biológico para prevenir el crecimiento de patógenos en plantas (Mercier y Manker, 2005; Fernando y Nawalage, 2011). Además, hay un creciente interés en el estudio de los efectos promotores del crecimiento vegetal de estas mezclas de MV (Hyakumachi y Kubota, 2004; El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006). En la industria alimentaria, las mismas propiedades de control biológico se utilizan para prevenir el crecimiento de hongos después de la cosecha, en lo que se denomina "micofumigación" (Lee et al., 2009; Park et al., 2010). Más recientemente, los MV de hongos han sido estudiados por su papel potencial como combustible, conocido popularmente como "micodiesel" (Morath et al., 2012).

### **2.6.3 Volátiles Emitidos como Respuesta al Estrés Biótico**

En la naturaleza existen MS volátiles que se encuentran liberados de forma natural y los inducidos. La mayoría de los volátiles emitidos de forma natural normalmente son liberados por frutos sanos e intactos y se convierten en metabolitos volátiles inducidos los que se producen después de daño foliar o algún tipo de estrés lo que cambia forma cualitativa y cuantitativa estas emisiones (Van Den Boom et al., 2004; Vuorinen et al., 2004). Por ejemplo, el

**Cuadro 4.** Estructuras, funciones y olores de metabolitos volátiles comunes emitidos por hongos.

Molécula	Estructura	Función; olor
1-Octan-3-ol		Semioquímico; terroso
Acetato de 3-metil 1-butanol		Antifúngico; plátano
$\beta$ -carofileno		Promotor de crecimiento en plantas; madera
1,8-Cineol		Antifúngico; alcanfor

Fuente: Morath et al. (2012)

daño mecánico en maíz libera una mezcla de volátiles diferente a la producida por herbívoros masticadores (Bautista-Lozada et al., 2012). En contraste con la emisión de volátiles emitidos de forma natural, los volátiles inducidos se producen después de que la planta o el fruto ha sufrido algún daño o infección por cualquier microorganismo (Cardoza et al., 2002; Jansen et al., 2009; Blasioli et al., 2010) así como también por factores abióticos ya sea falta o exceso de agua, falta de nutrientes, luz, entre otros (Vickers et al., 2009). La ventaja de estos MV inducidos es que son sintetizados *de novo* sólo cuando es necesario y por lo tanto, son más económicos en términos de carbono y no reducen el funcionamiento de la planta o fruto (Close y McArthur, 2002).

Varios estudios indican que el ataque por hongos también altera la biosíntesis y emisión de metabolitos volátiles. Jansen et al. (2009), inocularon plantas de tomate con el hongo *Botrytis cinerea*, y detectó diferencias entre el perfil de volátiles emitidos por hojas inoculadas comparadas con un testigo que estaban libres de la infección. Estos volátiles fueron detectados e identificados por cromatografía de gases acoplados a un espectrofotómetro de masas (CG-MS). Se detectaron principalmente productos de la ruta de la lipoxigenasa y monoterpenos (**cuadro 5**), los cuales aumentaron al avanzar el proceso de la infección.

El aumento de las emisiones de productos LOX demostró ser un fuerte indicador de una respuesta al estrés provocado por el hongo, lo que indica que las emisiones de MV se pueden utilizar para detectar estrés de la planta en una etapa temprana.

Recientemente, se realizó un estudio para detectar y clasificar tres enfermedades poscosecha en frutos de arándano, en base a la emisión de volátiles mediante un sensor de gas o nariz electrónica (Li et al., 2010). Las enfermedades analizadas fueron las causadas por *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, y *Colletotrichum gloeosporioides*. Los autores identificaron seis metabolitos en los frutos infectados y el testigo: (1) estireno; (2) 1-metil-2-(1-metiletil) benceno; (3) eucaliptol; (4) undecano; (5) tujopseno (1aS,4aS,8aS-

**Cuadro 5.** Metabolitos volátiles emitidos en mayor concentración por hojas de tomate inoculadas con *Botrytis cinerea*.

<b>Productos derivados de LOX</b>	<b>Monoterpenos</b>
cis-3-Hexenal	$\beta$ -Feladreno
cis-3-Hexenol	$\alpha$ -Feladreno
trans-2-Hexenal	2-Careno
1-Penten-3-ol	Limoneno
cis-3-Hexenil	Pineno

Fuente: Jansen et al. (2009)

2,4a,8,8-Tetrametil-1,1a,4,4a,5,6,7,8-octahidrociclopropano) (**cuadro 6**). Se observaron diferencias en el perfil de esos metabolitos entre los diferentes tratamientos, detectándose en el testigo los metabolitos del 1 al 3; mientras que los primeros cuatro metabolitos volátiles fueron detectados en los frutos infectados por los hongos *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*, y en el caso de los frutos infectados por *A. alternata* se detectaron los 5 metabolitos. Es importante señalar que el terpenoide tujopseno fue detectado sólo en los frutos infectados con *A. alternata*.

Hay una amplia diversidad de MV inducidos durante la interacción planta-patógeno, incluyendo alquenos, alcanos, ácidos carboxílicos y alcoholes, pero los metabolitos dominantes tienden a ser los terpenos y los metabolitos volátiles productos de la LOX (Van Den Boom et al., 2004). Las emisiones de los órganos dañados de las plantas pueden ocurrir como un resultado del daño mecánico, independientemente de cualquier influencia de organismos bióticos (Fall et al., 1999). En respuesta al daño, algunos productos derivados de la vía de LOX tales como (Z)-3-hexenilo de etilo son también liberados de las hojas intactas más jóvenes cuando un herbívoro está dañando la planta, lo que indica que la ruta de la lipoxigenasa (LOX) que oxida productos catabólicos de ácidos grasos, ha sido activado (Dudareva et al., 2004). La mayoría de los productos de LOX no son específicos de ningún taxón vegetal. Alguno de estos metabolitos estimulan la producción de ácido jasmónico y la síntesis *de novo* de homo y sesquiterpenos (Reddy et al., 2002). Los monoterpenos forman casi el 100% de las emisiones totales de metabolitos volátiles de plantas intactas de repollo, mientras que cuando algún herbívoro causa algún daño, estos metabolitos aumentan en su emisión pero la proporción disminuye por debajo de 60%, debido a que los homoterpenos y sesquiterpenos también son inducidos (Vuorinen et al., 2004).

Aunque ciertas especies de plantas infectadas por diferentes patógenos pueden emitir volátiles similares, así como también diferentes especies de plantas pueden emitir los mismos MV después de haber sido infectadas con un mismo

**Cuadro 6.** Metabolitos volátiles detectados en frutos de arándano inoculados con tres géneros diferentes de hongos.

Compuesto	Concentración de volátiles (ng/Kg)			
	Testigo	<i>Alternaria alternaria</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
Estireno	0.03548	0.04696	0.04694	0.02551
1-Metil-2-(1-metiletil)-benceno	0.00493	0.01428	0.01646	0.02966
Eucaliptol	0.00404	0.03115	0.03897	0.01791
Undecano	-	0.01674	0.02460	0.02435
Tujopseno	-	0.03478	-	-

Fuente: Li et al. (2010)

patógeno, se sugiere que el perfil de los MV emitido puede ser específico para una cierta interacción planta-patógeno (Jansen et al., 2011).

#### **2.6.4 ¿El Perfil de Volátiles Inducido es Específico a un Determinado Patógeno?**

Un primer argumento que apoya la presencia de una mezcla específica de MV por un determinado patógeno proviene de estudios moleculares sobre la interacción (Baron y Zambryski, 1995; Kombrink y Somssich, 1995; Huang et al., 2003). Se reconocen tres importantes vías de señalización en el mecanismo de defensa que participan en las interacciones bióticas de plantas: el ácido jasmónico, el ácido salicílico y la vía de etileno (Koornneef y Pieterse, 2008).

Estas vías de señalización conducen de forma individual a tres respuestas diferentes, tales como la producción de un cierto volátil o volátiles. Sin embargo, hay una extensa comunicación entre estas señales, que conduce a interacciones antagonistas y sinergistas. Por ejemplo, amplia evidencia científica muestra que los ácidos jasmónico y salicílico pueden actuar de forma antagonista (Zarate et al., 2007). Generalmente, las defensas dependientes del ácido salicílico se activan más fuertemente en respuesta a agentes patógenos biotróficos; mientras que las defensas dependientes de ácido jasmónico y etileno se activan en respuesta a patógenos necrotrofos (como *Botrytis* spp., y *Alternaria* spp.) y herbívoros (Koornneef y Pieterse, 2008). En el maíz, la emisión de MV inducidos por herbívoros se redujeron aproximadamente un 50% cuando las plantas también estaban infectadas con un patógeno biotrofo (Rostás et al., 2006). Un posible mecanismo de lo que ocurre es que la infección fúngica induce las defensas dependientes del ácido salicílico, lo que reduce la señalización por la vía de ácido jasmónico debido a la interacción antagónica entre estas vías (Koornneef y Pieterse, 2008).

Otro argumento que apoya la presencia de MV específicos en una cierta interacción planta-patógeno proviene de estudios de herbívoros con plantas. Por ejemplo, los insectos usan la información volátil de la planta que es inducida por el ataque de herbívoros. En este enfoque, las plantas liberan metabolitos volátiles que actúan como señales para atraer sólo ciertos parásitos que ataquen dichos herbívoros (Dicke, 2009). En un estudio realizado, plantas de papa fueron expuestas a diferentes organismos, un patógeno (*Phytophthora infestans*), y cuatro tipos de herbívoros; ácaros (*Tetranychus urticae*), trips (*Frankliniella occidentalis*), áfidos (*Myzus persicae*), y orugas (*Spodoptera exigua*). Los resultados mostraron la emisión de diferente perfil de MV. Aunque todas las mezclas contenían los mismos metabolitos principales, tales como salicilato de metilo, numerosos productos derivados de la LOX, (*E*)-4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno (DMNT), (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11 tridecatetraeno (TMTT), (*E*)- $\beta$ -ocimeno y  $\alpha$ -farneseno, cada mezcla fue característica de cada organismo, lo cual se pudo concluir con la ayuda de un análisis multivariado de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) (Jansen et al., 2011). Cardoza et al. (2002) inocularon plantas de cacahuete, *Arachis hypogaea* con moho blanco (*Sclerotium rolfsii*), y emitieron una mezcla de metabolitos orgánicos que difiere tanto cuantitativa como cualitativamente de la mezcla emitida por las plantas dañadas por larvas de gusano de la remolacha (*Spodoptera exigua*) así como también de plantas sanas. El ataque del gusano indujo la liberación de productos de lipoxigenasa (hexenol, hexenal, y hexenilo), terpenoides, e indol. El salicilato de metilo compuesto derivado de la planta y el compuesto 3-octanona producido por el hongo, se detectaron sólo en las muestras de plantas infectadas con el hongo. Estos resultados muestran que diferentes factores bióticos pueden desencadenar la liberación de metabolitos volátiles específicos para cada estresor.

Por todo lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue analizar los metabolitos volátiles libres emitidos por frutos de tomate como respuesta a la infección causada por el fitopatógeno *Alternaria alternata*; así como también identificar

metabolitos volátiles que puedan ser indicadores del inicio de la infección utilizando una técnica no destructiva.

### 3. HIPOTESIS

Existen metabolitos volátiles específicos que se producen antes de la manifestación de los síntomas característicos de la enfermedad causada por *Alternaria alternata* en el fruto de tomate que pueden ser indicadores del inicio de infección.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Evaluar los cambios en el perfil de metabolitos volátiles en frutos de tomate infectados por *Alternaria alternata*, bajo condiciones de almacenamiento y comercialización, indicadores de la infección temprana causada por este patógeno.

### 4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Optimizar la técnica para la detección de compuestos volátiles libres.
- ✓ Determinar los volátiles producidos por el hongo *A. alternata*.
- ✓ Determinar los cambios en el perfil de metabolitos volátiles en frutos de tomate sano e infectado con *A. alternata*, bajo temperatura de almacenamiento (15°C) y comercialización (20°C).
- ✓ Determinar el inicio y desarrollo de la infección en frutos de tomate infectado con *A. alternata*, bajo temperatura de almacenamiento (15°C) y comercialización (20°C).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Selección del Material Vegetal

Se utilizaron frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) tipo bola var. 'Rutgers' en estado de madurez rojo claro, de tamaño uniforme y libre de daños visuales. Para determinar el estado de madurez de los frutos, al inicio del experimento se les determinó la producción de etileno y CO<sub>2</sub> (Troncoso-Rojas et al., 2005).

### 5.2 Preparación de Cultivos de *A. alternata*

Se utilizó una cepa de *Alternaria alternata* previamente aislada de frutos de tomate infectados, y conservada en refrigeración en el laboratorio de Biotecnología de Vegetales de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Se evaluó la viabilidad y capacidad infectiva del hongo inoculando frutos de tomate con la cepa. Se consideró como cepa viable al desarrollarse la infección en los frutos inoculados.

### 5.3 Preparación del Inóculo

A partir de cepas puras del patógeno se preparó una suspensión de esporas utilizando colonias de 7-10 días de crecimiento. Las esporas se obtuvieron raspando suavemente la superficie del micelio utilizando agua destilada estéril. Se determinó la concentración de esporas en la suspensión obtenida con ayuda de un microscopio y una cámara de Neubauer, de acuerdo al método descrito por (French y Hebert, 1980; Troncoso-Rojas et al., 2005). Se utilizaron diferentes concentraciones de esporas ( $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  esporas/mL) con el fin de determinar la concentración mínima necesaria para el desarrollo de la infección y a la cual se pueden detectar los volátiles emitidos por frutos inoculados.

### 5.4 Inoculación de Frutos de Tomate

Los frutos de tomate se agruparon en dos lotes. Se lavaron con hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm para eliminar o reducir la carga microbiana inicial, se enjuagaron con agua destilada estéril y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente, un grupo se inoculó por inmersión en las suspensiones de esporas de *A. alternata* previamente preparada. El segundo lote se sumergió únicamente en agua destilada estéril, se dejó secar a temperatura ambiente y se consideró como testigo. Los frutos se dividieron en dos sublotes y se colocaron en cámaras de refrigeración para simular condiciones de almacenamiento (15 °C) y comercialización (20°C).

## 5.5 Detección de Metabolitos Volátiles por Cromatografía de Gases

### 5.5.1 Optimización del Método de Detección de Metabolitos Volátiles Libres

Se estableció el método de detección de los metabolitos volátiles evaluando diferentes parámetros: a) el tipo de fibra a utilizar en la técnica de microextracción en fase sólida (MEFS), b) tiempos de adsorción y desorción, c) tipos de columna, y d) condiciones cromatográficas. Se evaluaron tres tipos de fibra con diferente polaridad: 100  $\mu\text{m}$  polidimetilsiloxano (PDMS), 75  $\mu\text{m}$ /85  $\mu\text{m}$  Polidimetilsiloxano/Carboxen (PDMS/CAR), 60  $\mu\text{m}$  Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (DVB/PDMS), (Supelco, USA). Se evaluaron cinco tiempos de adsorción: 5, 10, 30, 60 y 120 minutos, así como también tres tiempos de desorción: 5, 10 y 15 min. Se evaluaron cuatro columnas con distinta polaridad: columna capilar de sílica fundida DB-1 (dimetilpolisiloxano, 30 m, 0.5  $\mu\text{m}$ , 0.25 mm d.i.), columna capilar de sílica fundida con fase enlazada DB-5 (fenilmetilpolisiloxano, 30 m, 0.5  $\mu\text{m}$ , y 0.25 mm d.i.), columna capilar de sílica fundida con fase enlazada DB-Wax (polietilenglicol, 30 m, 0.2  $\mu\text{m}$ , y 0.25 mm d.i.) (J&W Scientific Inc. Folsom CA), y columna capilar de sílica fundida Supelcowax 10 (30 m, 0.25  $\mu\text{m}$ , 0.25 mm, Supelco-Sigma-Aldrich, USA), en un cromatógrafo de gases (CG) Agilent 5975C.

### 5.5.2 Metabolitos Volátiles Emitidos *por Alternatia alternata* Bajo Condiciones *In Vitro*

El hongo se sembró en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés), se incubó a una temperatura entre  $26\pm 2^\circ\text{C}$  por 10 días. Se

determinó la emisión de los volátiles en tiempo real usando la técnica de espacio de cabeza y MEFS. Para la adsorción de los metabolitos volátiles de las placas, se utilizó una fibra PDMS/CAR (75  $\mu\text{m}$ , Sigma-Aldrich), que se expuso durante 60 min a temperatura ambiente.

Los metabolitos volátiles fueron posteriormente desorbidos en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases Agilent 5975C equipado con una columna capilar Supelcowax 10 (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ; Supelco, USA), y un detector de ionización de flama. La detección de estos metabolitos se realizó de acuerdo al método reportado Facundo et al. (2012) con los ajustes correspondientes. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: temperatura del puerto de inyección y del detector fue de 250°C. Se utilizó el siguiente programa de temperatura: 40°C temperatura inicial (5 min), incremento de 5°C/min hasta 70°C, manteniéndose así durante 1 min, incremento de 10°C/min hasta 150°C, ésta última se mantuvo durante 8 min. Se utilizó helio como gas acarreador, a una velocidad de 1 mL/min.

La identificación de los metabolitos volátiles se realizó por comparación de los tiempos de retención obtenidos con respecto a los registrados con estándares de alta pureza (Sigma-Aldrich). Se confirmaron mediante un detector de masas cuadrupolo Triple-Axis HED-EM (Agilent) operado con una energía de ionización de 70 eV, y un rango de masas de 35-400  $m/z$ . Las temperaturas de la línea de transferencia y de la trampa de iones fueron 250 y 180°C, respectivamente. Se compararon los espectros obtenidos de las muestras contra los reportados en la biblioteca NIST 2011 del detector de masas (Salas Salazar et al., 2011).

### **5.5.3 Metabolitos Volátiles Emitidos por Tomate Sano e Infectado con *A. alternata***

Los frutos inoculados o no con el patógeno se colocaron en forma individual dentro de recipientes de vidrio de 400 mL de capacidad. La tapadera de los contenedores se adaptó con una septa PTFE de silicón de 20 mm de diámetro para la toma de muestra. Se determinó la emisión de los volátiles en tiempo real usando la técnica de espacio de cabeza, para lo cual se utilizaron 4 frutos por tratamiento y diferentes temperaturas (15 y 20°C). Se tomó una muestra de los volátiles del espacio de cabeza a los siguientes tiempos de muestreo: 0, 3, 6, 9, 24, y 48 horas. El análisis de los volátiles se realizó por cromatografía de gases siguiendo la metodología previamente descrita en la sección 5.5.2.

### **5.5.4 Precisión del Método Cromatográfico**

Se utilizaron 10 estándares obtenidos de la compañía Sigma-Aldrich: hexanal; acetato de 2-metilbutil; 3-metilbutanol; acetato de hexilo; trans-2-hexenal; 6-metil-5-hepten-1-ona; cis-3-hexanol; nonanal; 2-isobutiltiazol; y acetato de etilo . Se prepararon a una concentración de  $2.5 \times 10^{-3}$  µg/mL, se colocó 1 µL de cada estándar en un vial de 4 mL y se adsorbieron por triplicado mediante la técnica de MEFS. Se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$C_V = \frac{\sigma}{|\bar{x}|} \cdot 100$$

Dónde:

CV: Coeficiente de variación

$\sigma$ : Desviación estándar

$\bar{X}$ : Promedio de las mediciones

## 5.6 Determinación del Inicio y Desarrollo de la Infección en Tomate Causada por *A. alternata*

Se registró el desarrollo de la infección por *A. alternata* en frutos de tomate a diferentes tiempos: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96 y 144 horas. Se midió el tamaño de la lesión en la superficie de los frutos con ayuda de un vernier y los resultados se reportaron en milímetros cuadrados (Troncoso-Rojas et al., 2005).

## 5.7 Diseño de Experimentos

Para optimizar el método de detección de metabolitos volátiles por la técnica de microextracción en fase sólida y cromatografía de gases, se utilizó un diseño completamente al azar para los parámetros: tipo de fibra, y tiempos de adsorción, tomando como variable respuesta el área total de los metabolitos volátiles detectados.

El análisis de los metabolitos volátiles emitidos por frutos de tomate sano e infectado, así como por el hongo *Alternaria alternata*, se realizó mediante un análisis descriptivo.

Para determinar el efecto de la temperatura en el perfil de los metabolitos volátiles emitidos por frutos de tomate sano, se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de dos factores AxB, en donde A: representó el

factor temperatura con dos niveles (15 y 20°C), y B: representó el tiempo de muestreo con 3 niveles (0, 24 y 48 horas).

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para estimar diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) y se aplicó la prueba de comparación de medias por el método de Tukey-Kramer, mediante el programa estadístico NCSS (2007).

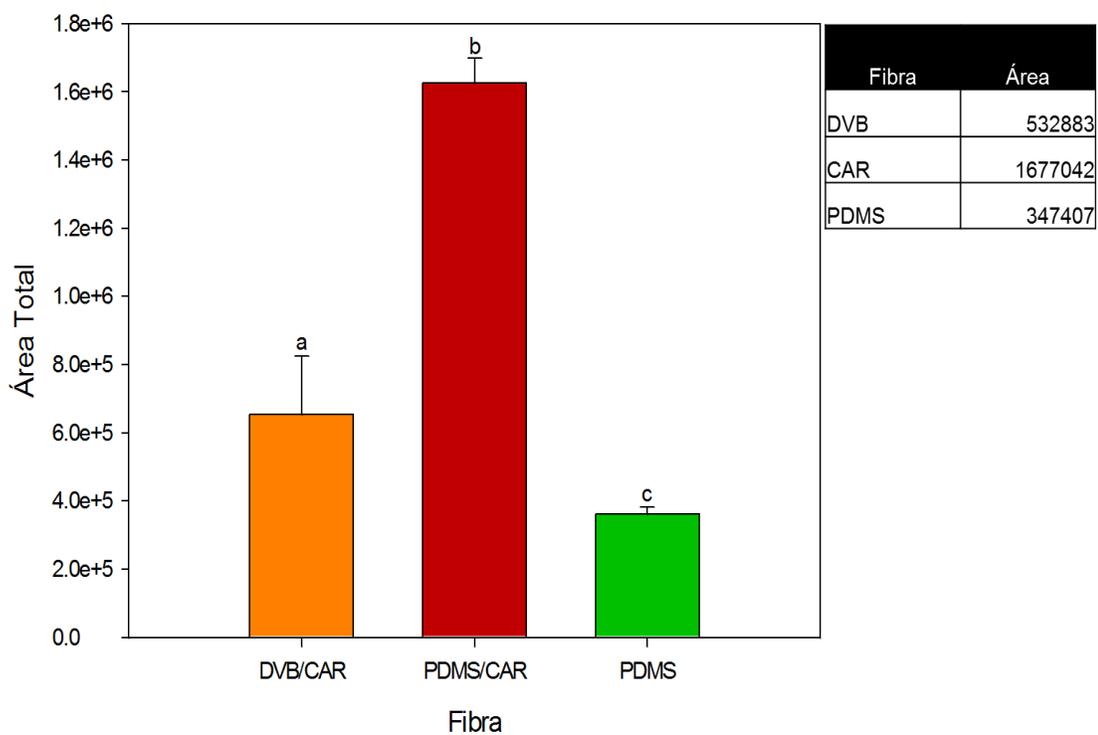
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Optimización del Método de Detección de Metabolitos Volátiles Libres de Tomate

Se optimizaron los parámetros para la separación e identificación de los metabolitos volátiles mediante cromatografía de gases. La confirmación de los metabolitos volátiles se hizo mediante un detector de masas.

#### 6.1.1 Selección de la Fibra en MEFS

Los resultados de la evaluación de los tres tipos de fibras (polidimetilsiloxano (PDMS), carboxen/divinilbenceno (CAR/DVB); polidimetilsiloxano/carboxen (PDMS/CAR) las cuales poseen distinta polaridad para la adsorción de volátiles libres de frutos de tomate mediante la técnica de microextracción en fase sólida, mostraron que la fibra bipolar CAR/PDMS, con un tiempo de adsorción de 60 minutos y una columna completamente polar (Supelcowax 10) presentó mayor capacidad de adsorción de los volátiles, como puede apreciarse en la **figura 5**. La adsorción de los volátiles con la fibra CAR/PMDS registró un área total de



**Figura 5.** Área total de metabolitos volátiles libres detectados en frutos de tomate por cromatografía de gases y adsorbidos con diferentes fibras utilizadas en la microextracción en fase sólida. Las barras de error indican el error estándar de la media ( $n = 3$ ).

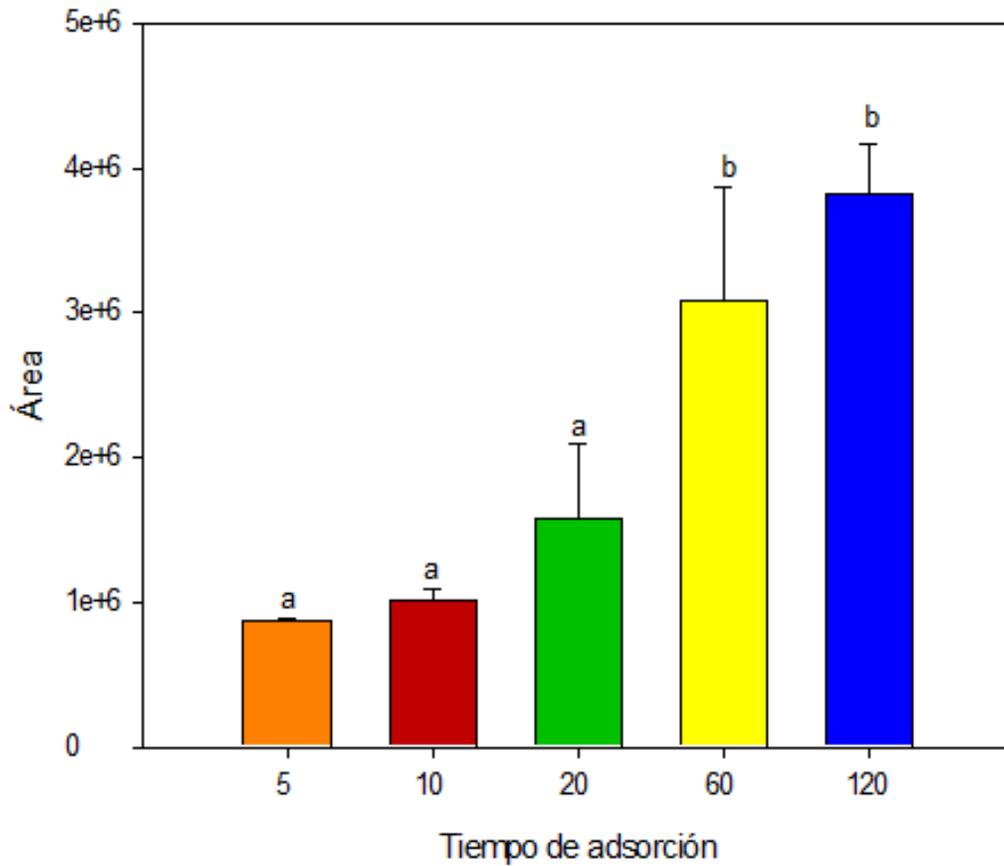
1,677,042 unidades de área, el cual fue mayor que las otras dos fibras evaluadas.

La naturaleza de los metabolitos que recubren la fibra PDMS/CAR la hacen una fibra bipolar lo cual le dio una mayor capacidad de adsorción y captación de estos MV. Además, la fibra contiene micro y macro poros que permiten una mayor migración de los analitos hacia la fibra, favoreciendo la adsorción de metabolitos de bajo peso molecular como C<sub>2</sub>-C<sub>14</sub>. Estos resultados coinciden con los reportados por Beltran et al. (2006), quienes utilizaron la misma fibra para adsorber metabolitos responsables del aroma en frutos de tomate macerado y homogenizado.

### **6.1.2 Tiempos de Adsorción de la Fibra CAR/PDMS**

Un parámetro importante a considerar en un buen desarrollo de MEFS es el tiempo mínimo para generar un espacio de cabeza saturado (Peñalver Hernando, 2002). En la **figura 6** se muestran los resultados del tiempo de adsorción sobre el área de los volátiles detectados. Se puede observar que hubo un incremento gradual en el área total de MV, al incrementarse el tiempo de adsorción, a diferencia de Díaz de León-Sánchez et al. (2009) que utilizaron fruto de tomate homogenizado y observaron que 10 minutos o más de adsorción mediante MEFS no hubo diferencia significativa.

Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre los 60 y 120 minutos. Estos resultados coinciden con los publicados (Beltran et al., 2006), quienes determinaron los metabolitos volátiles del aroma y el sabor de frutos de tomate utilizando MEFS seguida de CG-MS utilizando este mismo tiempo de adsorción. Con base en los resultados obtenidos, se establece que el tiempo que permitió una mayor adsorción de metabolitos volátiles con la fibra PDMS/CAR fue de 60 minutos.



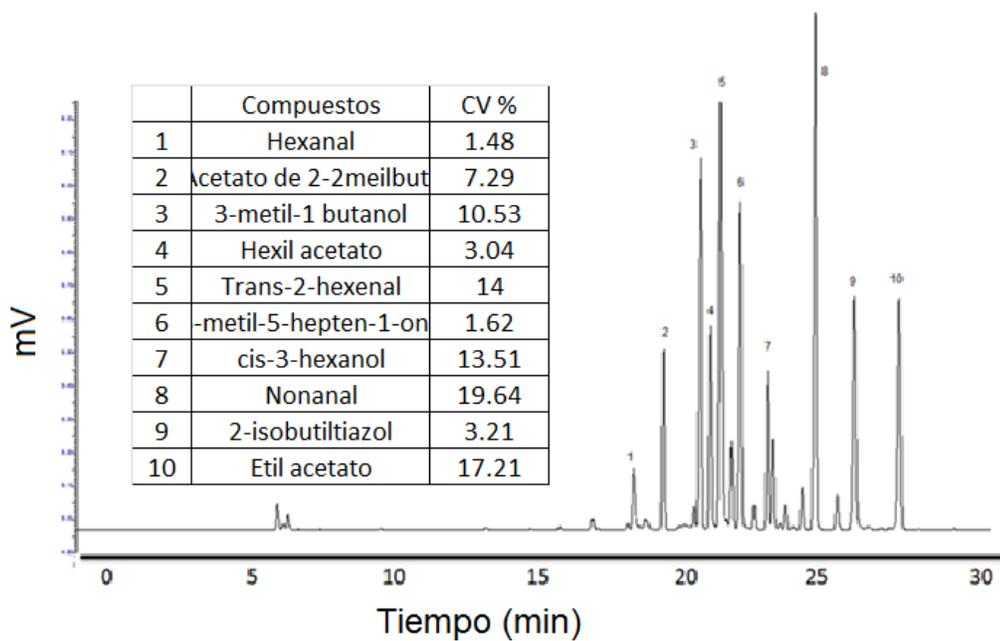
**Figura 6.** Área total de los metabolitos volátiles libres emitidos por frutos de tomate, adsorbidos con la fibra Polidimetilsiloxano/Carboxen a diferentes tiempos de adsorción y detectados por CG. Las barras de error indican el error estándar de la media ( $n = 3$ ).

### 6.1.3 Precisión del Método Cromatográfico para la Detección de Metabolitos Volátiles Libres

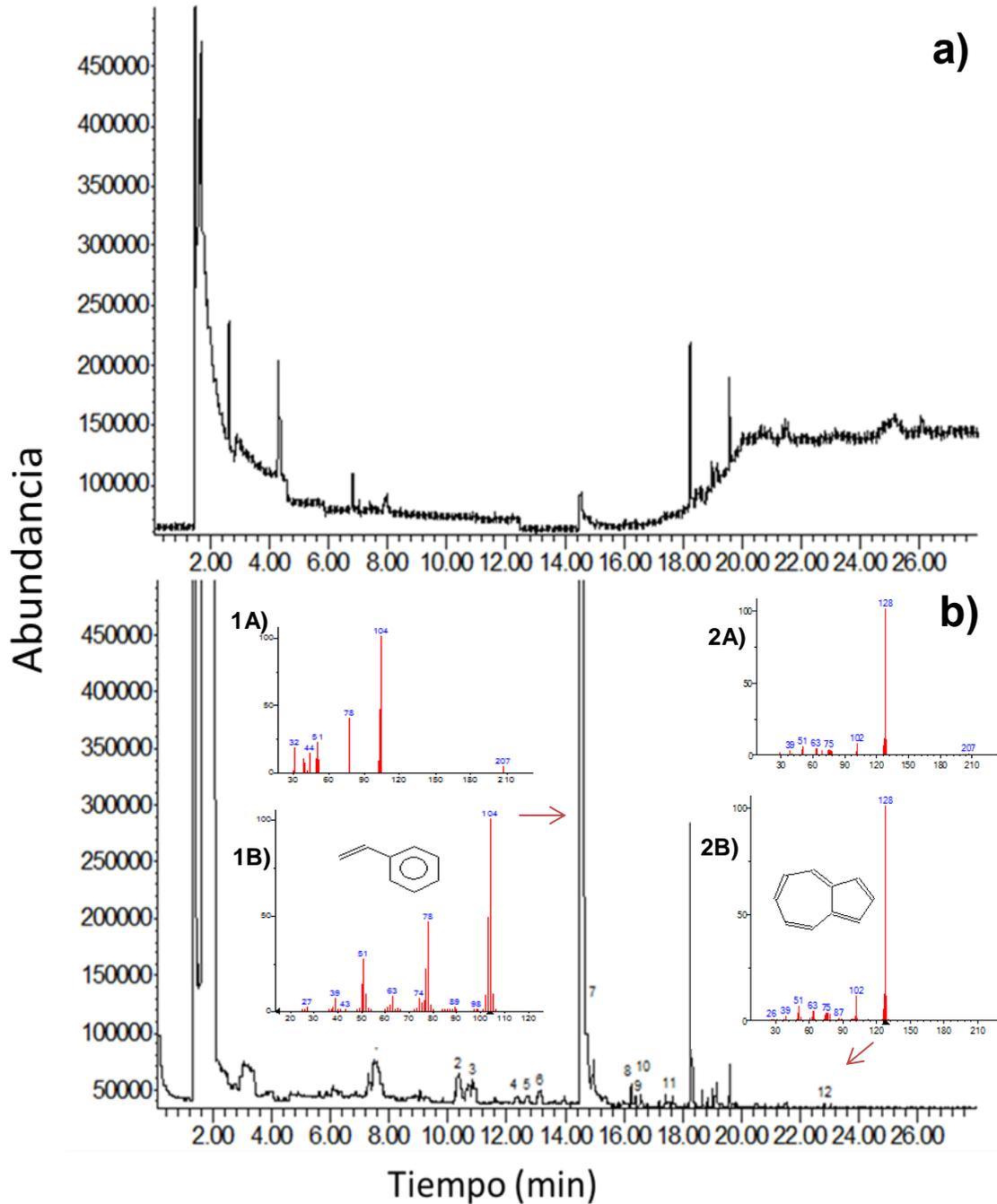
En la **figura 7** se presenta un cromatograma de la mezcla de los estándares volátiles comerciales utilizados en este estudio. Como se puede observar, los estándares se detectaron a diferentes tiempos de retención obteniéndose una buena resolución, con un tiempo de corrida cromatográfica de 27 minutos, donde, el primer volátil de interés para el estudio presentó un tiempo de retención de (18 minutos ) y el último estándar en separarse fue a los (26 minutos ). Por lo tanto, la utilización de la técnica de microextracción en fase sólida, así como las condiciones cromatográficas utilizadas (descritas en el apartado 5.6.3), permitió una óptima separación de los estándares, con un coeficiente de variación (CV) de 1.48 % (Hexanal), 7.29 % (Acetato de 2-metilbutil), 10.23% (3-Metil,1-butanol), 3.04 % (Acetato de hexil), 14.00 % (Trans-2-hexenal) , 1.02 % (6-Metil-5-hepten-1-ona), 13.51 % (Cis-3-hexanol), 16.21 % (Acetato de etil), 20.97 % (Nonanal) y 3.21 % (2-Isobutitiazol) y estos presentaron coeficientes de variación por debajo del 20% a excepción de Nonanal, por lo que el método propuesto presenta una repetibilidad adecuada.

### 6.2 Metabolitos Volátiles Emitidos por *Alternaria alternata* bajo Condiciones *In Vitro*

En la **figura 8** se presenta un cromatograma de los metabolitos volátiles detectados en placas de PDA sin el hongo (**figura 8a**), así como también un cromatograma de los MV detectados en muestras de *Alternaria alternata* creciendo en el medio de cultivo PDA (**figura 8b**). En la **figura 8a** se puede observar que se detectaron varios picos bien definidos, los cuales fueron



**Figura 7.** Cromatograma de una mezcla de estándares obtenido por microextracción en fase sólida con una fibra de Polidimetilsiloxano/Carboxen y cromatografía de gases (CV: coeficiente de variación) (n = 3).



**Figura 8.** Metabolitos volátiles libres detectados en *A. alternata* por cromatografía de gases acoplado a un detector de masas y microextracción en fase sólida con la fibra Polidimetilsiloxano/Carboxen: a) medio PDA; b) medio PDA inoculado con una cepa de *A. alternata* después de 10 días de incubación. 1A) Patrones de fragmentación de la muestra (estireno), 1B) Patrones de fragmentación del estireno de la biblioteca NIST 2011. 2A) Patrones de fragmentación de la muestra (azuleno), 2B) Patrones de fragmentación del azuleno de la biblioteca NIST 2011. Los números incluidos en la figura 8b corresponden a los incluidos en el **Cuadro 7**.

liberados por el medio de cultivo PDA sin el hongo. De esos metabolitos, solo se pudo identificar el pico detectado al tiempo de retención de 14.5 minutos, correspondiendo éste al estireno. En la **figura 8b**, se presentan los volátiles detectados en muestras del hongo. Estos volátiles se detectaron a tiempos de retención diferentes con los detectados en las placas sin el hongo, con excepción del pico detectado a los 14.5 min. La mayoría de los picos detectados presentaron baja abundancia, mientras que el pico detectado a los 14.5 min, presentó una abundancia muy elevada. De los picos detectados, doce compuestos fueron identificados (**cuadro 7**) de acuerdo a los tiempos de retención obtenidos en los estándares comerciales utilizados en este estudio. Asimismo, los compuestos fueron confirmados mediante un detector de masas tipo cuadrupolo, de acuerdo a la comparación de los patrones de fragmentación de cada uno de los volátiles identificados en la muestra, con el reportado en la biblioteca NIST 2011 del detector de masas.

El análisis del espectro de masas del pico marcado con el número 7 en la figura 8b, el cual fue previamente identificado como estireno, presenta un patrón de fragmentación (**figura 8b 1A**) en donde se observa el ión padre con una masa de 104 m/z y sus iones hijos de 78 y 51 m/z. Este patrón de fragmentación fue muy similar al reportado en la biblioteca NIST del detector de masas (**figura 8b 1B**), por lo que se confirma que el compuesto corresponde a estireno. En el caso del pico marcado con el número 12 en la **figura 8b**, se obtuvo un patrón de fragmentación (**figura 8b 2A**) en donde se observó al ion padre con 108 m/z y los iones hijos con 102, 75, 63, 51 y 39 m/z. Este patrón de fragmentación presentó alta similitud con lo reportado en la biblioteca NIST (**figura 8b 2B**), por lo que se confirma la presencia de azuleno. Los otros compuestos identificados fueron confirmados de la misma manera (espectros no mostrados). Entre los metabolitos identificados se encuentran compuestos aromáticos, alcoholes, esterres y terpenos, como tolueno, metilbenceno, xileno, limoneno, estireno y azuleno. El compuesto detectado a los 14.5 min fue identificado como estireno, el cual también fue detectado en las placas Petri con PDA sin el hongo; sin

**Cuadro 7.** Metabolitos volátiles libres emitidos por *Alternaria alternata* a los 10 días de crecimiento en medio de cultivo PDA.

Número de pico	Tr (min)	Metabolitos volátiles
1	7.51	Tolueno
2	10.85	1-3 Dimetil benceno
3	10.38	Etilbenceno
4	12.40	Xileno
5	12.60	Limoneno
6	13.13	2-Metil,1-butanol
7	14.5	Estireno
8	16.26	Metilestireno
9	16.35	Ester del ácido 2-metil,2-butanoico,2 metil ester
10	16.80	3,3,4-Trimetil-5-fenil,1-penteno
11	17.66	Heptametil-1-noneno
12	23.22	Biciclo (5,3,0) decapentaeno (Azuleno)

embargo, su intensidad fue mucho mayor en las muestras tomadas del hongo con respecto a aquellas tomadas de las placas Petri sin *A. alternata*, por lo que se puede sugerir que el hongo está liberando ese compuesto.

Pagot et al. (2007) sugieren que dentro del metabolismo del hongo *Penicillium camemberti* las enzimas fenilalanina amonio-liasa y la descarboxilasa del ácido cinámico están implicadas en el proceso de convertir la fenilalanina en estireno. Por otra parte, se ha reportado que la fenilalanina es un producto de biosíntesis de glucosa (Snell et al., 1996), y debido a que la glucosa es la fuente de carbono en el medio de cultivo PDA, es posible que el hongo *A. alternata* pueda sintetizar y emitir este MV tal y como se ha reportado por (Beck et al., 2008) en *Fusarium oxysporum*. La producción de estireno también se ha reportado en otras especies de hongos como: *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus niger*, *Emericella* sp., *Mucor plumbeus* y *Trichoderma* sp. (Nieminen et al., 2008).

En general, los metabolitos volátiles detectados en *A. alternata* coinciden parcialmente con los reportados en la literatura. Schuchardt y Kruse (2009) analizaron los metabolitos volátiles producidos por 14 hongos que se encuentran comúnmente en el ambiente, entre los cuales se encontró *Alternaria alternata*. Los hongos se sembraron en diferentes medios de cultivo (agar extracto de Malta, agar Czapek-Dox, y agar "wallpaper plaster" en placas de vidrio y se detectaron e identificaron los volátiles por cromatografía de gases-masas utilizando Tenax para la adsorción de volátiles. Los MV detectados en *A. alternata* fueron: acetona, propanal, etanol, 1-propanol, 2-butanol, 3-metilfuran, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol y limoneno. De estos metabolitos, sólo los últimos dos coinciden con los detectados en el presente estudio. Los autores concluyen que el perfil de cada hongo depende de la especie y medio de cultivo, así como también de la técnica utilizada y las condiciones de extracción. Los metabolitos volátiles detectados en nuestro estudio como: 3,3,4-trimetil-5-fenil,1-penteno, éster del ácido 2-metil,2-butanoico y azuleno, no se encontraron reportados para el hongo *A. alternata*.

Los metabolitos volátiles emitidos por los hongos pueden ser utilizados como indicadores de su presencia. En los últimos años se han realizado varios estudios sobre la detección de metabolitos orgánicos volátiles microbianos considerados como indicadores de contaminación con hongos, como el realizado por Lamanaka et al. (2014). En ese estudio los autores adsorbieron mediante MEFS metabolitos volátiles emitidos por tres hongos: (*Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus luchuensis* y *P. crustosum*), que se encuentran comúnmente infectando el grano de café. Entre los MV detectados, el oct-1-en-3-ol se detectó en el café crudo infectado con *A. luchuensis* que no se encontró en café sano. Este compuesto se caracteriza por el olor a moho y tierra y puede estar relacionado con características negativas en la calidad y el análisis sensorial del café. Müller et al. (2013) caracterizaron y compararon el perfil del aroma de hongos micorrízicos, patógenos y saprófitos crecidos en placas de vidrio utilizando medio Melin-Norkrans, con el objetivo de utilizar estos perfiles como una herramienta para discriminar entre grupos y especies. Los autores encontraron que las especies de hongos difieren en sus perfiles de olor, en particular en el perfil de los sesquiterpenos. Este estudio apoya fuertemente el concepto de que los perfiles de los metabolitos volátiles se pueden utilizar para la identificación y detección no invasiva de diferentes grupos de hongos.

### 6.3 Metabolitos Volátiles Libres Emitidos por Tomate Sano e Inoculado con *Alternaria*

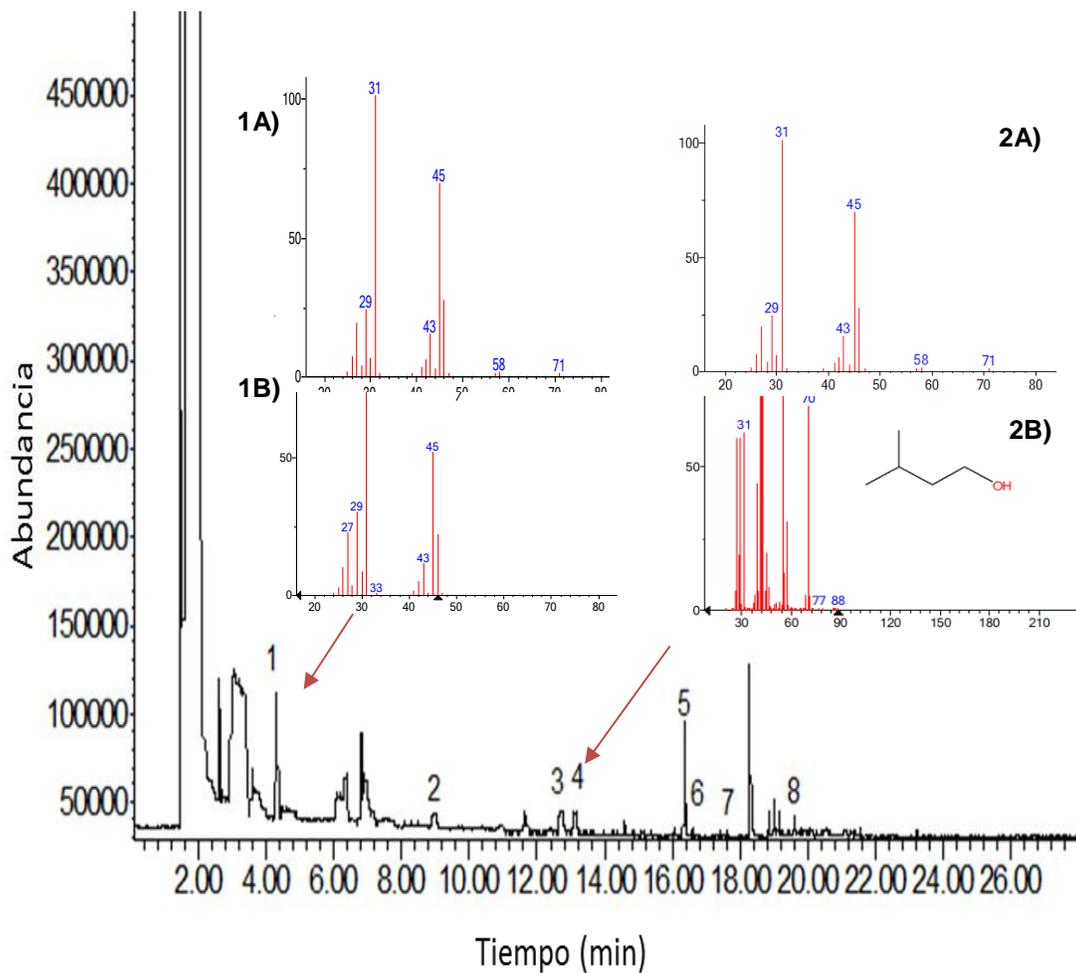
En este experimento se utilizaron frutos de tomate con una tasa respiratoria de  $20.28 \pm 1.89$  mL CO<sub>2</sub>/kg·h y una producción de etileno de  $4.50 \pm 1.19$  µL/kg·h, lo cual indica que el estado de madurez de los frutos fue entre rojo-claro y rojo-maduro. Estos resultados son similares a los reportados por Atta-Aly et al. (1998) quienes evaluaron la producción de etileno y la tasa respiratoria de frutos de tomate cv 'Rutgers'. Los autores reportaron una producción de etileno de

3.95 y 6  $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$  para los estados de madurez cambiante y rojo-maduro, respectivamente; mientras que la tasa respiratoria fue de 26 y 23  $\text{mL}/\text{kg}\cdot\text{h}$  de  $\text{CO}_2$ , respectivamente.

### 6.3.1 Metabolitos Volátiles Emitidos por Frutos Sanos.

En la **figura 9** se muestra el cromatograma de los metabolitos volátiles detectados en frutos de tomate sano. Se puede apreciar que se detectaron alrededor de 20 picos bien definidos y de éstos, 8 presentaron mayor abundancia. La identificación de estos 8 compuestos se realizó mediante la comparación de sus tiempos de retención con los obtenidos en los estándares comerciales. Asimismo, los compuestos fueron confirmados mediante un detector de masas tipo cuadrupolo, de acuerdo a la comparación de los patrones de fragmentación de cada uno de los volátiles identificados en la muestra, con el reportado en la biblioteca NIST 2011 del detector de masas.

El análisis del espectro de masas del pico marcado con el número uno en el cromatograma de la **figura 9**, el cual fue previamente identificado como etanol, presenta un patrón de fragmentación (**figura 9 1A**) en donde se puede apreciar el ion padre con una masa de 46  $\text{m}/\text{z}$  y sus iones hijos de 45, 43, 29 y 31  $\text{m}/\text{z}$ . Este patrón de fragmentación fue muy similar al reportado en la biblioteca de masas (**figura 9 1B**), por lo que se confirma que el compuesto uno corresponde al etanol. En el caso del pico marcado en el cromatograma de la **figura 9** con el número 4, el cual fue previamente identificado como 3-metil,1-butanol, presenta un patrón de fragmentación (**figura 9 2A**) en el que se puede apreciar el ion padre con una masa de 88  $\text{m}/\text{z}$  y los iones hijos 55 y 70  $\text{m}/\text{z}$ . Este patrón de fragmentación también presentó una alta similitud con el reportado en la biblioteca (**figura 9 2B**) del detector de masas, confirmando la presencia del compuesto 3-metil,1-butanol. Los otros compuestos identificados mediante los tiempos de retención también fueron confirmados de la misma manera (espectros no mostrados). Dentro de los volátiles identificados y confirmados en



**Figura 9.** Metabolitos volátiles detectados por cromatografía de gases acoplado a un detector de masas y microextracción en fase sólida con la fibra Polidimetilsiloxano/Carboxen en fruto de tomate sano a las 48 horas de almacenamiento a 20°C. 1A) Patrones de fragmentación de la muestra (etanol), 1B) Patrones de fragmentación del etanol de la biblioteca NIST 2011. 2A) Patrones de fragmentación de la muestra (3-metil, 1-butanol), 2B) Patrones de fragmentación del 3-metil, 1-butanol de la biblioteca NIST 2011. Los números de los picos corresponden a los enlistados en el **cuadro 8**.

tomate sano se encontraron varios alcoholes, aldehídos, cetona, metabolitos azufrados y terpenos. Entre estos metabolitos, se identificaron volátiles derivados de la vía de la LOX (hexanal), volátiles derivados de la ruta del mevalonato (limoneno), del catabolismo de carotenoides (6-metil-5-hepten-1-ona) y volátiles derivados de la ruta del ácido siquímico y del metabolismo de aminoácidos (etanol, 3-metil,1-butanol, benzaldehído) (**cuadro 8**). Los metabolitos que presentaron mayor abundancia relativa fueron: 6-metil-5-hepten-1-ona y 3-metil,1-butanol, con valores de 41.22 y 42.71%, respectivamente. Por otro lado el nonanal presentó la abundancia relativa más baja (0.27%).

Estos resultados coinciden parcialmente con los reportados en la literatura. Beltran et al. (2006) en su estudio del análisis del aroma de tomate homogenizado, utilizando cromatografía de gases-masas comparando los métodos de trampa-purga y microextracción en fase sólida, detectaron alrededor de 39 metabolitos volátiles, entre los cuales identificaron los siguientes metabolitos: hexanal, nonanal, limoneno, 6-metil-5-hepten-1-ona, 2-isobutiltiazol, entre otros, los cuales también fueron detectados en el presente estudio. Asimismo, Carbonell-Barrachina et al. (2006) utilizaron la técnica de espacio de cabeza dinámico para detectar el aroma de los cultivares de tomate 'Muchamiel', 'De la Pera', 'Ulises' en estado de madurez rojo claro, detectando tres metabolitos que coinciden con los encontrados en este estudio (hexanal, 6-metil-5-hepten-1-ona, 2-isobutiltiazol) a partir de muestras homogenizadas. Tikunov et al. (2005) detectaron en frutos de tomate homogenizados, hasta 70 metabolitos volátiles responsables del aroma del tomate, entre los cuales 3 metabolitos encontrados coinciden con los identificados en el presente trabajo (6-metil-5-hepten-1-ona, hexanal y benzaldehído).

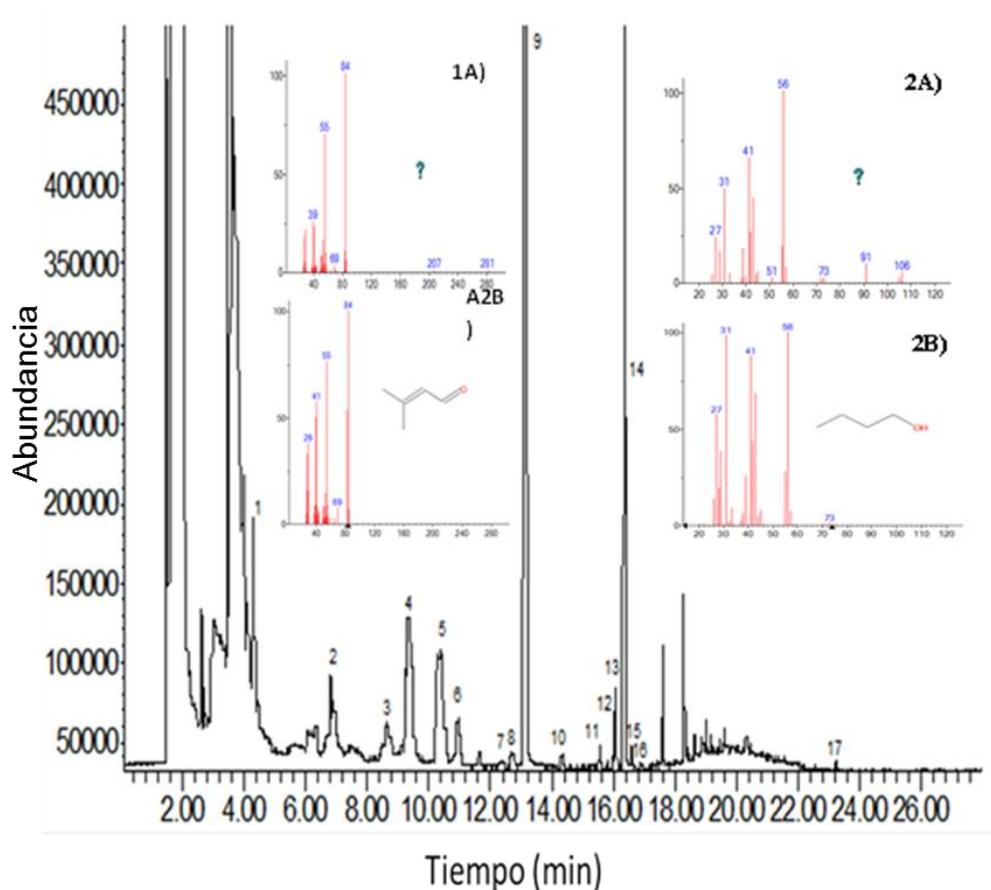
**Cuadro 8.** Metabolitos volátiles libres detectados en frutos de tomate sano a 20°C.

<b>Número de pico</b>	<b>Tr (min)</b>	<b>Metabolitos volátiles</b>	<b>Abundancia relativa (%)</b>
1	4.03	Etanol	4.02
2	9.01	Hexanal	1.28
3	12.7	Limoneno	7.90
4	13.13	3-Metil,1-butanol	41.22
5	16.35	6-Metil-5-hepten-1-ona	42.71
6	16.73	Nonanal	0.27
7	17.5	2-Isobutiltiazol	1.65
8	19.6	Benzaldehído	0.91

### 6.3.2 Metabolitos Volátiles Libres Emitidos por Frutos de Tomate Infectados por *A. alternata*

En la **Figura 10** se presenta el cromatograma obtenido por CG-MS de los metabolitos volátiles detectados en frutos de tomate inoculado con *A. alternata* almacenados a 20°C. Como puede observarse, se detectaron varios picos (alrededor de 45) a diferentes tiempos de retención, observándose 15 compuestos con mayor abundancia. Estos compuestos fueron identificados de acuerdo a la comparación de sus tiempos de retención con respecto a los obtenidos en los estándares comerciales utilizados en el presente estudio. Asimismo, los compuestos identificados fueron confirmados mediante la comparación de los espectros obtenidos en cada uno de los compuestos con los reportados en la biblioteca del detector de masas.

El análisis del espectro de masas del pico marcado en el cromatograma de la **figura 10**, con el número 4 identificado previamente como 3-metil,1-butenal presentó un patrón de fragmentación (**figura 10 1A**) en donde se observa el ión padre con una masa de 84 m/z y sus iones hijos de 55 y el 69 m/z. Este espectro fue muy similar al reportado en la biblioteca del detector de masas (**figura 10 1B**), por lo que se confirma que el compuesto corresponden al 3-metil,1-butenal. De igual forma, el compuesto marcado en el cromatograma de la **figura 10** con el número 6, fue previamente identificado como 1-butanol. La confirmación de este compuesto se realizó por comparación de su espectro de masas con el reportado en la biblioteca NIST 2011. El análisis del espectro de masas presentó un patrón de fragmentación (**figura 10 2A**), en donde el ion padre tuvo una masa de 73 m/z y los iones hijos de 56, 41, 31 y 27 m/z. Este patrón de fragmentación presentó alta similitud con lo reportado en la biblioteca (**figura 10 2B**), por lo que se confirma que el compuesto corresponde al 1-butanol. Los otros compuestos identificados fueron confirmados de la misma manera (espectros de masas no mostrados). Dentro los volátiles identificados y



**Figura 10.** Metabolitos volátiles detectados por cromatografía de gases acoplado a un detector de masas y microextracción en fase sólida con la fibra Polidimetilsiloxano/Carboxen en frutos de tomate infectados con *A. alternata*, 48 horas de almacenamiento a 20°C. 1A) Patrones de fragmentación de la muestra (3-metil,1-butenal), 1B) Patrones de fragmentación del 3-metil, 1-butenal de la biblioteca NIST 2011. 2A) Patrones de fragmentación de la muestra (1-butanol), 2B) Patrones de fragmentación del 1-butanol de la biblioteca NIST 2011. Los números en los picos corresponden a aquellos enlistados en el **cuadro 9**.

confirmados en tomate inoculado con el hongo *A. alternata*, se encontraron alcoholes (etanol, acetato de 2-metil,1- butenol, 3-metil,1-butanol, 1-butanol, 2-metil,1-butenol, 4-metil,1-pentanol, 1-hexanol), aldehído (3-metil,2-butenal), cetona (6-metil-5-hepten-1-ona), metabolitos aromáticos (tolueno, estireno, biciclo (5,3,0) decapentaeno (azuleno), xileno), metabolitos azufrados (dimetil disulfuro, 2-isobutiltiazol), compuesto nitrogenado (1-nitrobutano), y terpeno (limoneno) (**cuadro 9**). El compuesto volátil 6-metil-5-hepten-1-ona presentó la mayor abundancia relativa (44.36 %); mientras que los alcoholes fueron los metabolitos predominantes con una abundancia relativa total de 41.44%.

El perfil de metabolitos volátiles detectados en los frutos de tomate inoculados con *A. alternata*, fue diferente al obtenido en el tomate sin inocular. En el primer caso, se detectó un mayor número de metabolitos y con mayor intensidad con respecto al fruto sano. En los frutos inoculados, los metabolitos: tolueno (2), dimetil disulfuro (3), 3-metil,2-butenal (4), acetato de 2-metil,1-butanol (5), 1-butanol (6), xileno (7), estireno (10), 1-nitrobutano (11), 2-metil,1-butenol (12), 4-metil,1-pentanol (13), 1-hexanol (15) y azuleno (17), no fueron detectados en los frutos sanos (los números entre paréntesis indican la posición del compuesto dentro del cromatograma de la **figura 10**). De estos metabolitos, tolueno, xileno, estireno y azuleno, fueron detectados en el hongo *A. alternata*, por lo que éstos podrían ser indicadores de la presencia del patógeno en el fruto de tomate. En cambio, los metabolitos dimetil disulfuro (3), 3-metil,2-butenal (4), acetato de 2-metil,1-butanol (5), 1-butanol (6), 1-nitrobutano (11), 2-metil,1-butenol (12), 4-metil,1-pentanol (13), y 1-hexanol (15), se detectaron únicamente en los frutos inoculados, por lo que éstos metabolitos pudieron ser sintetizados durante la interacción tomate-*Alternaria*, ya que patógenos inducen la producción de MV; que a causa de sus actividades antimicrobianas, probablemente inhibe la propagación de éste en los tejidos vegetales como mecanismo de defensa. Además, mutantes de tomate deficientes en la biosíntesis de la vía de la ruta de la LOX, son altamente susceptibles a pequeños ácaros y trips que se alimentan de hojas (Cardoza et al., 2002; Huang et al., 2003), mientras que el tratamiento con metil jasmonato (MeJA) restaura la

**Cuadro 9.** Metabolitos volátiles detectados en frutos de tomate inoculado y almacenado a 20°C, 48 horas post-inoculación.

<b>Número de pico</b>	<b>Tr (min)</b>	<b>Metabolitos volátiles</b>	<b>Abundancia relativa (%)</b>
1	4.03	Etanol	6.96
2	7.51	Tolueno	1.30
3	8.66	Dimetil disulfuro	3.62
4	9.32	3-Metil,2-butenal	2.35
5	10.27	Acetato de 2-metil,1-butanol	7.29
6	10.95	1-Butanol	9.22
7	12.36	Xileno	1.92
8	12.70	Limoneno	0.74
9	13.11	3-Metil,1-butanol	16.88
10	14.59	Estireno	0.171
11	15.56	1-Nitrobutano	0.80
12	15.99	2-Metil-1-butenol	0.32
13	16.08	4-Metil,1-pentanol	0.48
14	16.36	6-Metil-5-hepten-1-ona	44.36
15	16.59	1-Hexanol	0.61
16	17.6	2-Isobutiltiazol	2.82
17	23.24	Biciclo (5,3,0) decapentaeno (Azuleno)	0.106

resistencia. Asimismo, en los frutos inoculados se detectaron metabolitos volátiles que también se detectaron en los frutos sanos, pero con mayor intensidad. Tal es el caso de los metabolitos: etanol (1) y 6-metil-5-hepten-1-ona (14), los cuales presentaron mayor área (11.5 y 19.13%) que en los frutos sanos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los reportados por Bianchi et al. (2009), quienes inocularon tomates procesados con tres microorganismos: una bacteria (*E. coli*), un hongo (*Aspergillus carbonarius*) y una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) con el fin de discriminar al microorganismo causante de la infección. Los autores detectaron hasta 100 MV, entre los cuales se identificaron los siguientes: etanol, 1-butanol, 1-hexanol, 6-metil-5-hepten-1-ona, etilbenceno, y hexanal. Estos metabolitos fueron detectados a los dos días posteriores a la inoculación. Los resultados de este trabajo coinciden parcialmente con los obtenidos en nuestro estudio, ya que los metabolitos arriba mencionados, también se detectaron en el presente estudio. Sin embargo, la cantidad de metabolitos detectados fue mucho menor con respecto al estudio realizado por Bianchi et al. (2009). Esto puede ser debido a que estos autores utilizaron frutos procesados, alterando el perfil de MV en las muestras ya que el procesamiento del fruto puede poner en contacto enzimas con sustratos que antes no lo estaban, además que utilizaron otra técnica para la captación de volátiles; mientras que en nuestro estudio se utilizaron frutos frescos sin procesar y no se utilizaron gases de arrastre para una mayor extracción de los metabolitos.

Por otra parte, Hussaini et al. (2011), inocularon frutos de tomate con tres hongos diferentes *Fusarium oxysporum*; *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*. Los autores detectaron 11, 15 y 8 metabolitos únicos en frutos infectados para cada patógeno, respectivamente. Sin embargo, ninguno de los metabolitos identificados por los autores coincide con los identificados en nuestro estudio, lo cual puede ser debido a que los volátiles fueron extraídos de frutos macerados liberando agliconas, además que utilizaron diferentes solventes para una mayor

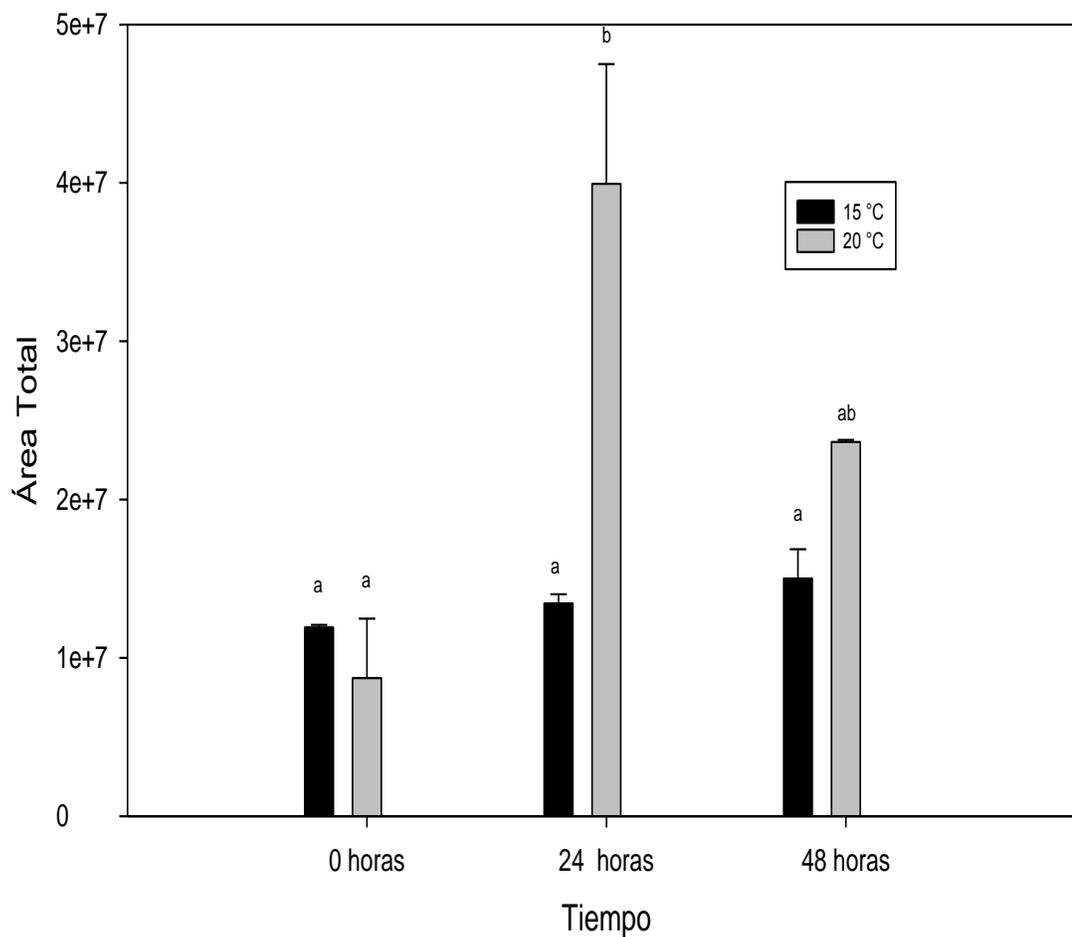
extracción. Este estudio sugiere que el perfil de los MV emitido por frutos infectados puede ser específico para una cierta interacción planta-patógeno y se puede utilizar como biomarcador para detectar enfermedades de tomate, patógeno u hongos toxigénicos en una etapa temprana de la enfermedad.

Todos los estudios anteriores utilizan una técnica destructiva y solvente para una mayor extracción para la discriminación de diferentes microorganismos infectando distintos frutos para detección de enfermedades; En este estudio el objetivo es la identificación temprana de la enfermedad por métodos no destructivos.

### **6.3.3 Efecto de la Temperatura en la Emisión de Metabolitos Volátiles en Frutos de Tomate**

En la **figura 11** se presentan los resultados del efecto de la temperatura en la detección de MV. Se puede observar que hay diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre las diferentes temperaturas, así como en los tiempos de muestreo y la interacción entre estos factores. En la **figura** se puede observar que a la temperatura de 15°C, el área total de los volátiles detectados fue muy similar en los 3 tiempos de muestreo, por lo que no se observaron diferencias significativas entre ellos. Esto puede ser debido a que a esta temperatura (15°C) la actividad del metabolismo y respiración es reducida (Suslow y Cantwell, 2000), por lo que no se aprecian cambios en la emisión de los MV durante las 48 horas de evaluación. Al comparar la temperatura de 15°C con la temperatura de 20°C, se observaron diferencias significativas, particularmente a partir de las 24 horas de exposición.

A la temperatura de 20°C, se observó un aumento en el área total de los metabolitos volátiles a las 24 horas con respecto al tiempo inicial. Al aumentar el tiempo de muestreo se observó una disminución en el área de los picos a las

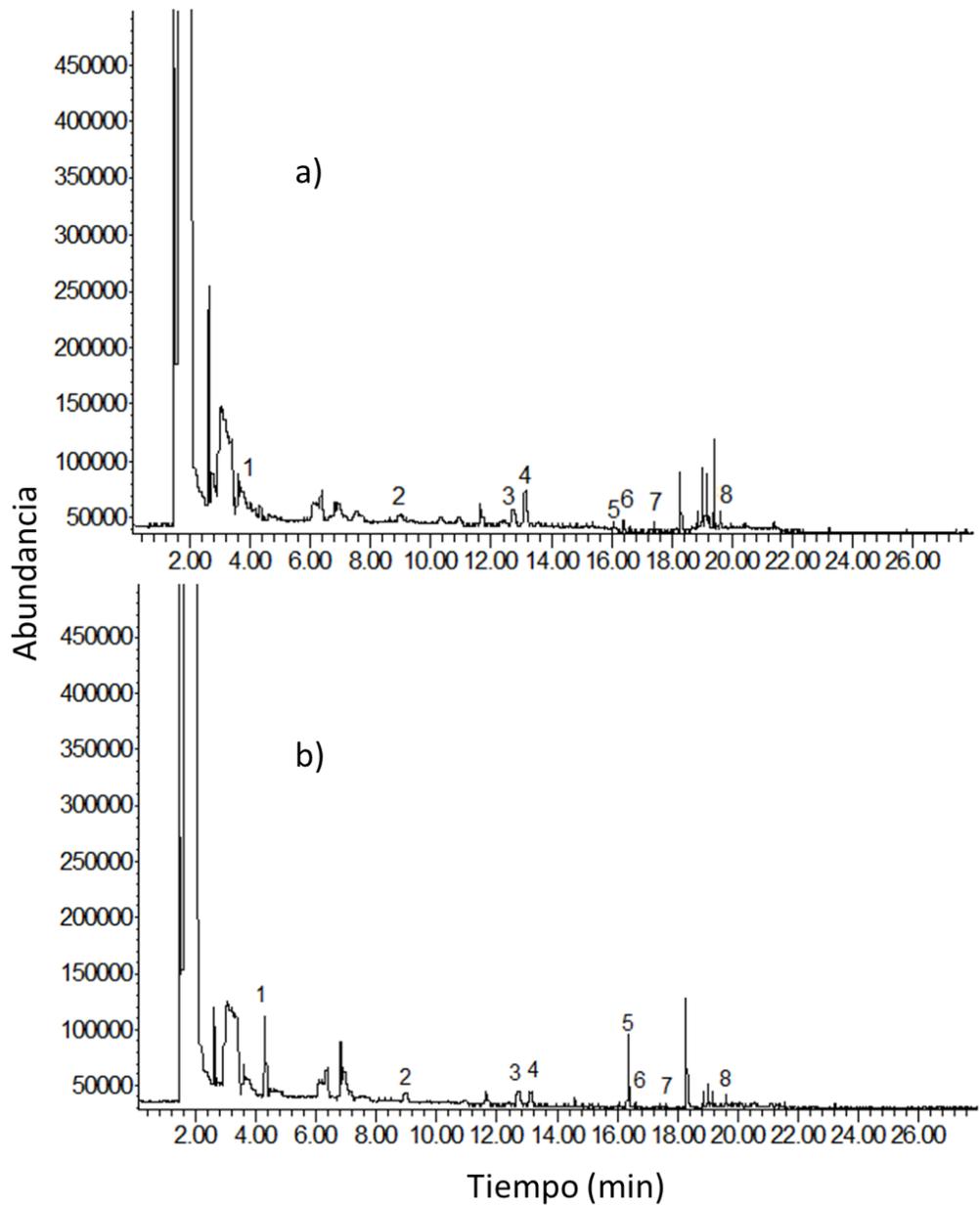


**Figura 11.** Comportamiento de metabolitos volátiles libres en frutos de tomate sin inocular a diferentes temperaturas (15 y 20°C) y tiempos de muestreo, adsorbidos mediante microextracción en fase sólida utilizando la fibra Polidimetilsiloxano/Carboxen y detectados por cromatografía de gases. Las barras significan la desviación estándar entre las muestras ( $n = 3$ ).

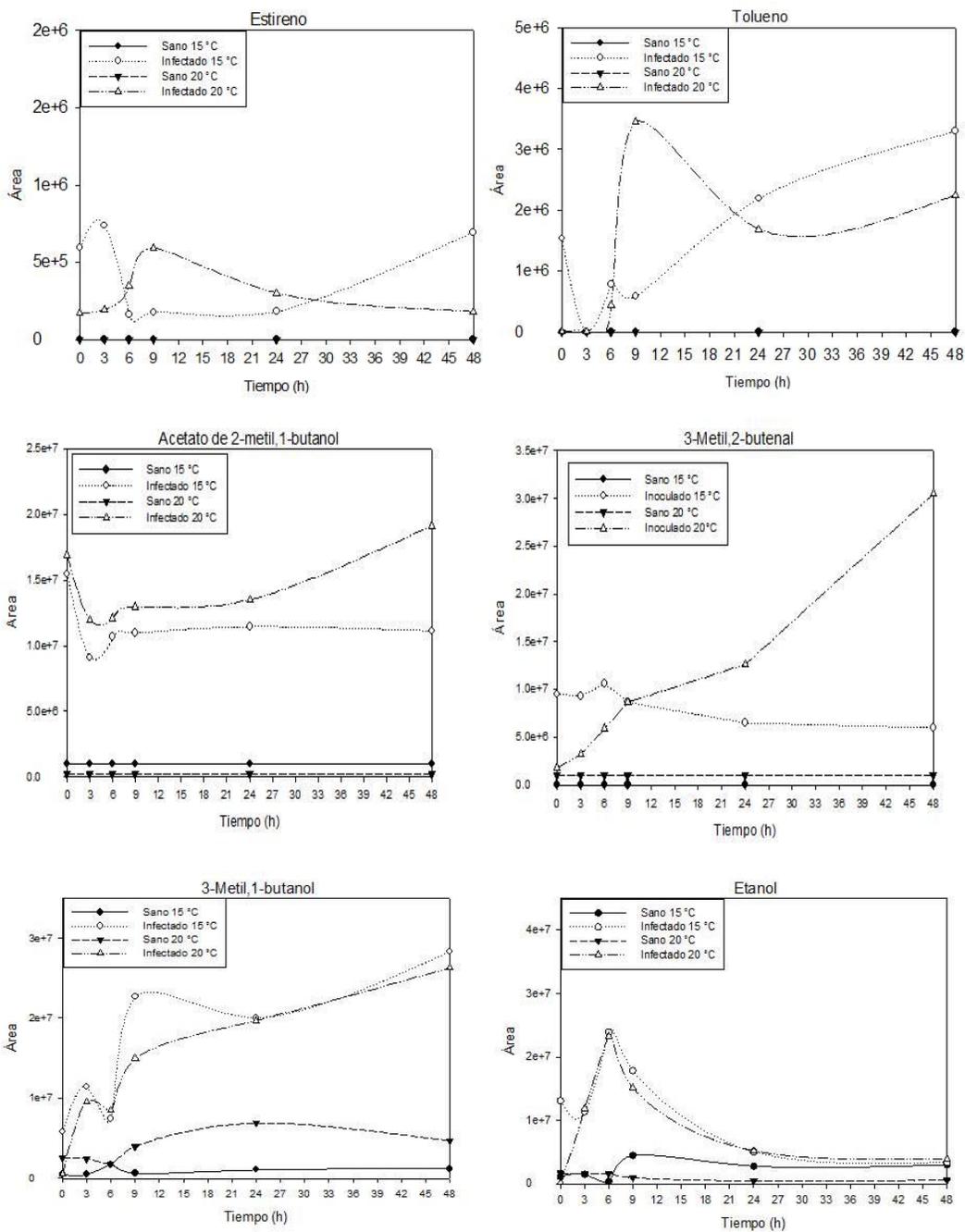
48 horas, lo cual puede ser debido a que los metabolitos volátiles se degradaron para dar lugar a la formación de otros metabolitos no volátiles o simplemente por alcanzar una mayor madurez y la emisión de volátiles se redujo. Como puede observarse en la **figura 12**, se detectaron los mismos metabolitos a las diferentes temperaturas, solo que en mayor abundancia en la temperatura más elevada.

Maul et al. (2000) describieron el aroma y el sabor de frutos de tomate homogenizado almacenado a cuatro diferentes temperaturas: 5, 10, 12.5 y 20°C. Los autores encontraron que a temperaturas menores a 12.5°C, los metabolitos volátiles mostraron concentraciones significativamente más bajas con respecto a las observadas a la temperatura de 20°C. Con base en esos resultados, los autores concluyeron que la temperatura afecta el aroma y sabor de los frutos de tomate. Por su parte, Díaz de León-Sánchez et al. (2009), compararon la temperatura de refrigeración (10°C) y de almacenamiento (20°C) en tomates en estado de madurez rojo claro para ver el efecto de la temperatura sobre el perfil de metabolitos volátiles responsables del aroma. Los autores observaron que la temperatura de refrigeración induce cambios en los niveles de ciertos volátiles y algunas de estas alteraciones pueden ser explicadas por la disminución de la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa, ya que ésta es una enzima clave en la ruta de la LOX, una de las rutas biosintéticas de MV.

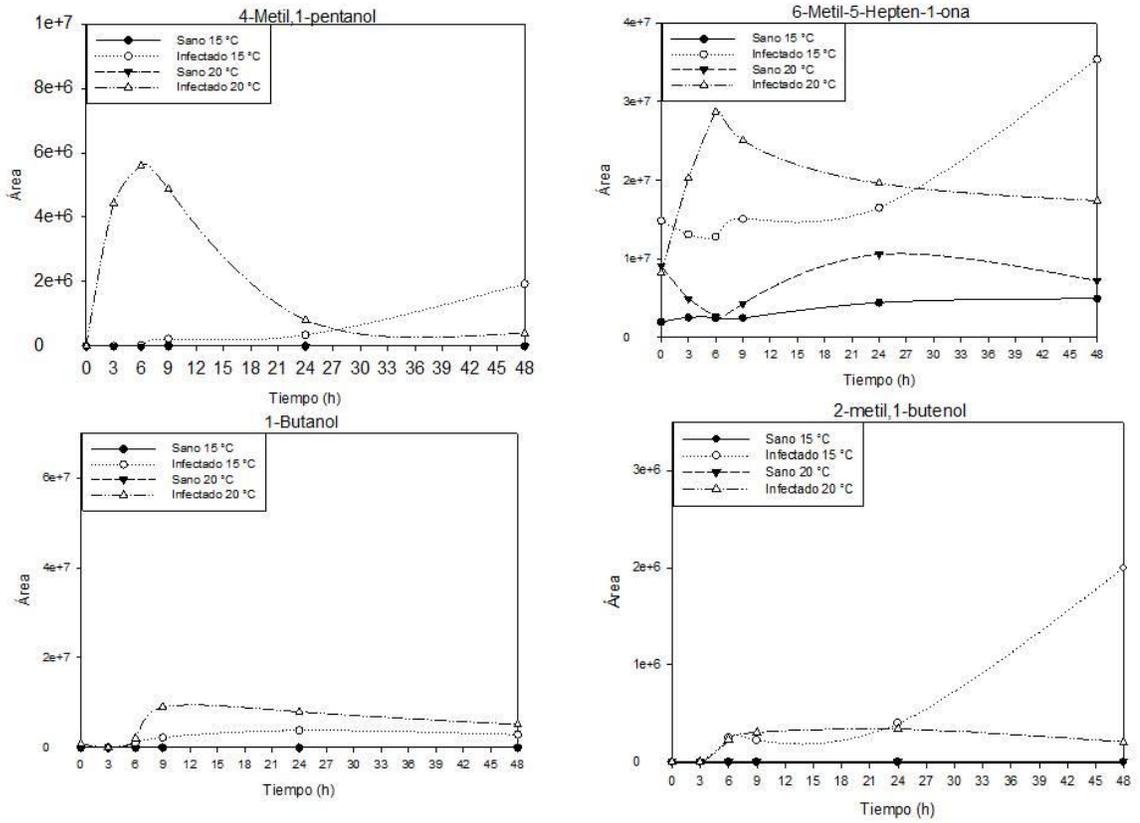
El perfil de los metabolitos volátiles en frutos de tomate sano e inoculado con *A. alternata* fue diferente con respecto a las temperaturas evaluadas y a los diferentes tiempos de muestreo. En las **figuras 13** y **14** se presenta el comportamiento de los metabolitos volátiles a 15 y 20°C con respecto al tiempo post-inoculación. En esta **figura** solo se incluyen los volátiles que se detectaron en los frutos inoculados que presentaron mayor intensidad que en frutos sanos. Por ejemplo, los metabolitos estireno y tolueno fueron detectados solo en los frutos inoculados y en el hongo; mientras que los metabolitos acetato de 2-metil,1-butanol, 2-metil butenal, 1-butanol, 2- metil,butenol y 4-metil,1-pentanol,



**Figura 12.** Metabolitos volátiles libres detectados por cromatografía de gases y microextracción en fruto de tomate sano, a las 48 horas de almacenamiento a las temperaturas de a) 15°C, y b) 20°C.



**Figura 13.** Comportamiento de los metabolitos volátiles: estireno, tolueno, acetato de 2-metil,1-butanol, 3-metil, 2-butenal, 3-metil,1-butanol y etanol, emitidos por frutos sanos e infectados a las diferentes temperaturas y los distintos tiempos de muestreo ( $n=4$ ).



**Figura 14.** Comportamiento de los metabolitos volátiles: 4-metil, 1-pentanol, 6-metil-5-hepten-1-ona, 1-butanol y 2-metil,1-butenol, emitidos por frutos sanos e infectados a las diferentes temperaturas y los distintos tiempos de muestreo ( $n=4$ ).

se detectaron únicamente en los frutos inoculados. Los metabolitos etanol, 3-metil,1-butanol y 6-metil-5-hepten-1-ona se detectaron con mayor intensidad en los frutos inoculados con respecto a los frutos sanos.

Se puede observar que los metabolitos estireno y tolueno solo se presentaron los frutos inoculados a las dos temperaturas, observándose una mayor emisión a 15°C, con respecto a la temperatura de 20°C. El comportamiento de tolueno a 20°C inicia con valores de cero y comienza a aumentar a las 6 horas alcanzando la máxima producción a las 9 horas después de la inoculación y posteriormente disminuye. En el caso del volátil estireno, se observó una máxima emisión en los frutos inoculados y mantenidos a 15°C, a las 3 horas posteriores a la inoculación; mientras que en los frutos inoculados y mantenidos a 20°C, la máxima emisión se registró a las 9 horas post-inoculación. Como se mencionó anteriormente, estos metabolitos también fueron detectados en las muestras de *A. alternata* por lo que podrían servir como indicadores de la presencia de este patógeno. Esto puede ser útil cuando los frutos se encuentran en almacenes, comercio o en transporte, en donde se puede detectar la presencia del patógeno, lo cual puede ser útil en la toma de decisiones para controlar o erradicar dicho hongo (Schwarze et al., 2000; Polizzi et al., 2012).

En el caso de los metabolitos volátiles etanol, 6-metil-5-hepten-1-ona, y 3-metil,1-butanol, se detectaron con mayor intensidad en los frutos inoculados con *Alternaria alternata*. Antes de las 24 horas post-inoculación, estos volátiles alcanzaron su máxima emisión en las dos temperaturas evaluadas. Evidencias científicas indican que el compuesto 6-metil-5-hepten-1-ona se deriva de la descomposición de licopeno durante la maduración (Ishida et al., 1993). Como puede observarse en la **figura 13**, en frutos sanos hubo una emisión constante de ese compuesto durante el período de evaluación; sin embargo, en los frutos inoculados con *A. alternata* se observó una mayor concentración de este compuesto desde las primeras horas post-inoculación.

El etanol es un metabolito final producido normalmente bajo respiración anaeróbica en muchas plantas superiores. Sin embargo, el etanol ha sido detectado como un compuesto volátil normal en manzana y muchas otras frutas maduras bajo condiciones aeróbicas (Corrales-García y Tlapa-Rangel, 1999). En la **figura 13** se muestra el comportamiento de etanol a los diferentes tiempos de muestreo. Se puede observar un incremento en la intensidad de este volátil durante las primeras horas post-inoculación. Posteriormente decrece hasta una intensidad similar a la observada en los frutos sanos. Moalemiyan et al. (2007) inocularon frutos de mango con dos patógenos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasiodiplodia theobromae*. Los autores detectaron etanol en todos los tratamientos, pero su abundancia fue mayor en mangos inoculados con *L. theobromae* y moderadamente alta en *C. gloeosporioides*, y muy baja en los testigo o no inoculados. El etanol también fue producido en gran abundancia en naranjas inoculadas con *Penicillium digitatum* (Pesis y Marinansky, 1990). Con base en estos resultados, se puede sugerir que la alta abundancia de etanol detectada en los tomates inoculados en comparación con los sanos, se puede utilizar para identificar tomates enfermos.

El metabolito volátil 3-metil,1-butanol es uno de los metabolitos de mayor impacto dentro de los volátiles característicos del aroma de frutos de tomate (Maróstica M. R, 2007). En este estudio, se detectó la presencia del 3-metil,1-butanol tanto en los frutos sanos como inoculados con el patógeno, observándose un incremento sustancial en los frutos inoculados a las 48 h de evaluación a ambas temperaturas (15 y 20°C), del 30 y 48.5%, respectivamente, con respecto a los frutos sanos.

Metabolitos como el 1-butanol, 4-metil,1-pentanol y 2-metil,1-butenol se detectaron a partir de las 6 horas post-inoculación. Fall et al. (1999) reportaron que hay una clase de metabolitos, principalmente productos de LOX, que se libera del tejido dañado a los 0-5 min después del daño; y posteriormente, una segunda clase de compuesto, mayormente terpenos y derivados de aminoácidos, que se sintetiza después de los daños, liberándose unas horas

después de que el daño inicial se llevó a cabo, como es el caso de estos MV. En un estudio realizado por Moalemiyan et al. (2007), se detectaron los metabolitos volátiles 1-butanol y 4-metil,1-pentanol en mangos infectados con *Colletotrichum gloeosporioides* y *L. theobromae*, respectivamente. Los metabolitos fueron detectados solo en los frutos inoculados con los patógenos, es decir, no se detectaron en los testigos o frutos sin inocular.

Por último, los metabolitos volátiles 3-metil,2-butenal y acetato de 2-metil,1-butanol, se detectaron en los frutos inoculados con el hongo, pero no en los frutos sanos y tampoco en el hongo *A. alternata*. Esos MV se detectaron desde la primera medición y durante los diferentes muestreos realizados, observándose una alta abundancia. Estos metabolitos no se han reportado anteriormente en frutos de tomate, pero si se han detectado en el aroma de chile pimiento (*Capsicum* spp.) (Jordan et al., 2002); mientras que el 3-metil,2-butenal se ha detectado en frutos de kiwi (Bogusz et al., 2012), y el acetato de 2-metil,1-butanol, se ha reportado en el aroma de frutos de melón (Beaulieu, 2005), y en manzana (Karlshoj, 2007). En éste último caso, la detección del acetato de 2-metil,1-butanol se ha utilizado para predecir el deterioro causado por *Penicillium expansum*.

Los resultados muestran que la mayoría de los metabolitos detectados en los frutos de tomate inoculados con *Alternaria alternata*, son alcoholes y aldehídos de bajo peso molecular. La detección de esos metabolitos volátiles puede ser debido a que las membranas celulares vegetales consisten en su mayoría de lípidos y proteínas. Los ácidos grasos poliinsaturados como el linoleico y el linolénico son los constituyentes comunes de las membranas vegetales. Cuando las plantas son infectadas por patógenos, diversos productos de lípidos, incluyendo los productos de descomposición, como volátiles de cadena corta C<sub>6</sub>, pueden formarse por medio de reacciones enzimáticas que implican a la lipoxigenasa, hidropoxidasa liasa e hidropoxidasa hidratasa (isomerasa y ciclasa), mediante vía de la lipoxigenasa. También se ha observado un incremento en la actividad de la enzima LOX cuando se ha infectado algún

tejido con patógenos (Koch et al., 1992; Vidhyasekaran, 2010). Jansen et al. (2009) reportaron desde las primeras horas post-inoculación un aumento de productos de LOX en hojas de tomate como respuesta al ataque del patógeno *Bortrytis cinerea*.

Los ácidos grasos en los fosfolípidos de membrana no son sustratos para la enzima LOX, por lo que la enzima hidrolasa ácido lipolítica (LAH) libera ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos de las membranas y así LOX puede oxidar esos ácidos grasos, activarse esta ruta y producirse los metabolitos volátiles. Estas dos enzimas (LAH y LOX) generalmente funcionan en combinación, ya que los ácidos grasos libres pueden ser degradados por LOX. Croft et al. (1993) observaron un aumento constante de la LAH durante la interacción huésped-patógeno en el cultivo de frijol resistente. También la oxidación de los lípidos de membrana puede ocurrir vía no enzimática mediante la acción de las especies reactivas de oxígeno (Vidhyasekaran (2010), pudiendo formar así distintos metabolitos volátiles.

#### 6.4 Determinación del Inicio y Desarrollo de la Infección por *A. alternata*

El desarrollo de la infección por *A. alternata* en frutos de tomate, se monitoreó a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9, 12, 48, 72, 96 y 144 h) a 15 y 20°C. Se pudo observar que durante las primeras 48 horas no se observó ningún síntoma visible de la enfermedad a las dos temperaturas evaluadas.

El tiempo de desarrollo de la infección en tomate causada por *A. alternata* fue diferente en las temperaturas evaluadas, siendo 20°C la temperatura en la cual la enfermedad se desarrolló de una manera más rápida. A 15°C los síntomas de la infección fueron visibles a las 96 horas post-inoculación (hpi) con una lesión de 1.089 mm<sup>2</sup>. Sin embargo, a 20°C el desarrollo de los síntomas fue más rápido, observándose los primeros síntomas de la infección a las 72 horas. A

ese tiempo, se registró una lesión de 2.79 mm<sup>2</sup> y a las 144 horas el tamaño de la lesión fue mayor, observándose un área de 20.32 mm<sup>2</sup> (**figura 15**). El hecho de que el desarrollo de los síntomas fue más rápido a 20°C con respecto a la temperatura de 15°C, puede ser debido a que la temperatura óptima para el crecimiento de *Alternaria spp.* oscila entre los 25 y 27°C (Pontón et al., 2002).

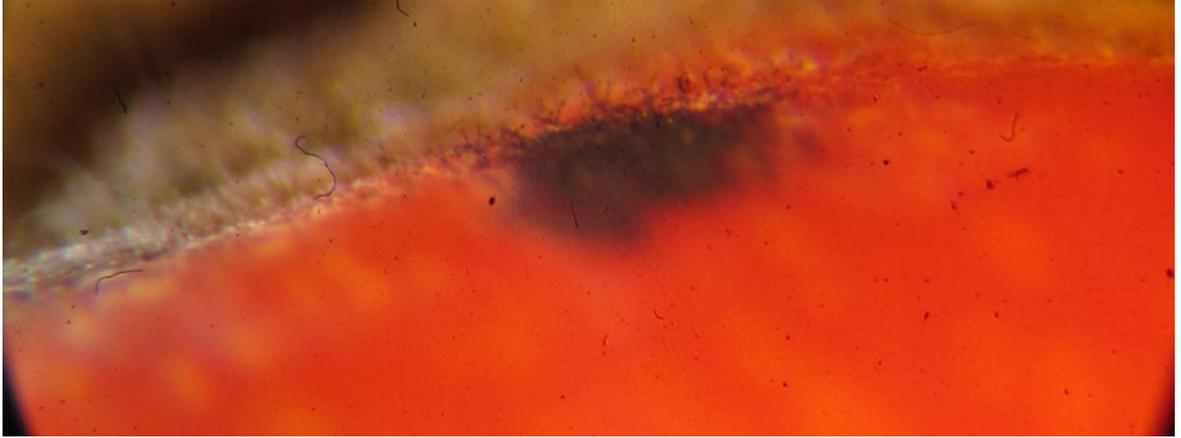
Estos resultados son similares a los reportados por Troncoso-Rojas et al. (2005) y Ojeda-Contreras et al. (2008) quienes encontraron que los primeros síntomas de la infección causada por *A. alternata* en frutos de tomate, fue a los 4 días a 20°C posteriores a la inoculación.

Los primeros síntomas de daño observados en los frutos fueron lesiones necróticas o puntos negros muy pequeños en la superficie del fruto. Estas lesiones se analizaron con ayuda de un estereoscopio, para confirmar la presencia del patógeno y descartar la posibilidad de desórdenes fisiológicos. Se observaron estructuras microscópicas características de *Alternaria*, como son las hifas color negras formadas por cadenas de conidias (**figura 16**), tal y como lo reportaron Pryor y Gilbertson (2000). La observación de estas estructuras microscópicas confirmó que la lesión en el fruto fue causada por el patógeno *Alternaria*.

Los metabolitos volátiles indicadores de la infección se detectaron en los frutos de tomate desde las primeras horas post-inoculación (3 horas) a las dos temperaturas; mientras que los primeros síntomas característicos de la enfermedad se observaron a partir de las 72 hpi a 20°C. Esto nos indica que los cambios en el perfil de metabolitos volátiles emitidos por frutos de tomate inoculados con el hongo, son detectados antes de que los síntomas de la enfermedad sean visibles.



**Figura 15.** Desarrollo de la infección por *A. alternata* en frutos de tomate a) 96 hpi, 15°C, b) 144 hpi, 15°C; c) 72 hpi, 20°C, d) 144 hpi, 20°C.



**Figura 16.** Lesión causada por *Alternaria alternata* en fruto de tomate en las primeras etapas de la enfermedad (Observación con Estereoscopio Leica MZ6).

## 6.5 Resumen de Resultados

Se optimizó una técnica utilizando microextracción en fase sólida y CG-MS con la fibra bipolar PDMS/CAR y la columna Supelcowax 10 para detección e identificación de metabolitos libres de *Alternaria* y frutos de tomate sin procesar.

Se identificaron 12 metabolitos volátiles emitidos por el hongo *Alternaria alternata*, entre los que se encuentran metabolitos aromáticos, alcoholes, ésteres y terpenos, como: tolueno, metilbenceno, xileno, limoneno, estireno y azuleno. Asimismo, se identificaron 8 metabolitos no reportados para *A. alternata* como: 3,3,4-trimetil-5-fenil,1-penteno; éster del ácido 2-metil,2-butanoico, azuleno, entre otros.

El perfil de los metabolitos volátiles en fruto de tomate inoculado con *A. alternata* fue diferente al registrado en el fruto sin inocular. En frutos de tomate inoculado a 15 °C y 20 °C se detectaron más de 40 metabolitos desde la primera hora post-inoculación, de los cuales se identificaron 10 y 12 metabolitos volátiles, respectivamente, que no fueron detectados en los frutos sanos.

La emisión de metabolitos volátiles libres fue mayor a la temperatura de comercialización (20°C) con respecto a la temperatura de almacenamiento (15°C).

Los frutos de tomate inoculados mostraron los primeros síntomas característicos de la enfermedad causada por *A. alternata*, a las 72 y 96 horas post-inoculación, a las temperaturas de 20 y 15°C, respectivamente.

## 7. CONCLUSIONES

La detección temprana de la enfermedad causada por *A. alternata* en frutos de tomate no procesado puede ser posible ya que se observaron cambios en el perfil de metabolitos volátiles emitidos por frutos sanos e inoculados con el hongo, desde la primera hora post-inoculación; mientras que los síntomas de la infección fueron visibles en el fruto a partir de las 72 horas a 20 °C posteriores a la inoculación.

La detección de la infección causada por *Alternaria alternata* de los metabolitos volátiles por la técnica de microextracción en fase sólida y cromatografía de gases, puede ser una técnica utilizada para la detección temprana de enfermedades en **postcosecha** de frutas y hortalizas.

## 8. REFERENCIAS

Abegaz, E., Tandon, K., Scott, J., Baldwin, E. y Shewfelt, R. 2004. Partitioning taste from aromatic flavor notes of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill) to develop predictive models as a function of volatile and nonvolatile components. *Postharvest Biology and Technology* 34(3): 227-235.

Agelopoulos, N., Chamberlain, K. y Pickett, J. 2000. Factors affecting volatile emissions of intact potato plants, *Solanum tuberosum*: variability of quantities and stability of ratios. *Journal of Chemical Ecology* 26(2): 497-511.

Andersen, B., Kroger, E. y Roberts, R. G. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research* 105(3): 291-299.

Atkins, S. D. y Clark, I. M. 2004. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of Applied Genetics* 45(1): 3-15.

Atta-Aly, M. A., Saltveit, M. E. y El-Beltagy, A. S. 1998. Saline growing conditions induce ripening of the non-ripening mutants nor and rin tomato fruits but not of Nr fruit. *Postharvest Biology and Technology* 13(3): 225-234.

Avalos-García, A. y Pérez-Urria, E. 2011. Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA (Biología)* 2(3): 119-145.

Baldwin, E. A. 2002. Fruit flavor, volatile metabolism and consumer perceptions. *Fruit quality and its biological basis* 1.

Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., Von Dahl, C. C. y Preston, C. A. 2006. Volatile signaling in plant-plant interactions: "talking trees" in the genomics era. *Science* 311(5762): 812-815.

Baron, C. y Zambryski, P. C. 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Annual review of genetics* 29(1): 107-129.

Bautista-Lozada, A., Bravo-Monzón, Á. E. y Espinosa-García, F. J. 2012. Importancia Ecológica de la Emisión de Compuestos Volátiles Vegetales. México, El Colegio de la Frontera Sur. México: 268-286 pp.

Beaudry, R. 2000. Aroma generation by horticultural products: what can we control? Introduction to the workshop. *HortScience* 35(6): 1001-1002.

Beaulieu, J. C. 2005. Within-season volatile and quality differences in stored fresh-cut cantaloupe cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(22): 8679-8687.

Beck, J. J., Merrill, G. B., Palumbo, J. D. y O'Keeffe, T. L. 2008. Strain of *Fusarium oxysporum* isolated from almond hulls produces styrene and 7-methyl-1, 3, 5-cyclooctatriene as the principal volatile components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(23): 11392-11398.

Beltran, J., Serrano, E., López, F. J., Peruga, A., Valcarcel, M. y Rosello, S. 2006. Comparison of two quantitative GC-MS methods for analysis of tomato aroma based on purge-and-trap and on solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385(7): 1255-1264.

Berna, A., Buysens, S., Natale, C. D., Grün, I., Lammertyn, J. y Nicolai, B. 2005. Relating sensory analysis with electronic nose and headspace fingerprint MS for tomato aroma profiling. *Postharvest Biology and Technology* 36(2): 143-155.

Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., Mattarozzi, M., Musci, M., Concina, I., Falasconi, M., Gobbi, E., Pardo, M. y Sberveglieri, G. 2009. Differentiation of the volatile profile of microbiologically contaminated canned tomatoes by dynamic headspace extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry analysis. *Talanta* 77(3): 962-970.

Blancard, D. 2011. Enfermedades del tomate. Mexico, Mundi-Prensa Libros: 17-30 pp.

Blasioli, S., Biondi, E., Braschi, I., Mazzucchi, U., Bazzi, C. y Gessa, C. 2010. Electronic nose as an innovative tool for the diagnosis of grapevine crown gall. *Analytica Chimica Acta* 672(1): 20-24.

Bogusz, J. S., Tavares, A. M., Zini, C. A. y Godoy, H. T. 2012. Analysis of the volatile compounds of Brazilian chilli peppers (*Capsicum* spp.) at two stages of maturity by solid phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Research International* 48(1): 98-107.

Brauss, M. S., Linforth, R. S. y Taylor, A. J. 1998. Effect of variety, time of eating, and fruit-to-fruit variation on volatile release during eating of tomato fruits (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(6): 2287-2292.

Bravo-Monzón, A. E. y Espinosa-García, F. J. 2008. Volatile emissions in *Persea americana* in response to the stem borer *Copturus aguacatae* attack. *Allelopathy Journal* 21(1): 165-174.

Breitmaier, E. 2006. Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones. Alemania, John Wiley & Sonspp.

Canoles, M., Soto, M. y Beaudry, R. 2005. Hydroperoxide lyase activity necessary for normal aroma volatile biosynthesis of tomato fruit, impacting sensory perception and preference. *Hortscience* 40(4): 1130-1131.

Carbonell-Barrachina, A., Agustí, A. y Ruiz, J. 2006. Analysis of flavor volatile compounds by dynamic headspace in traditional and hybrid cultivars of Spanish tomatoes. *European Food Research and Technology* 222(5-6): 536-542.

Cardoza, Y., Alborn, H. y Tumlinson, J. 2002. In vivo volatile emissions from peanut plants induced by simultaneous fungal infection and insect damage. *Journal of Chemical Ecology* 28(1): 161-174.

Caris-Veyrat, C., Schmid, A., Carail, M. y Böhm, V. 2003. Cleavage products of lycopene produced by in vitro oxidations: characterization and mechanisms of formation. *Journal of agricultural and Food Chemistry* 51(25): 7318-7325.

Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Argentina: 118.

Close, D. C. y McArthur, C. 2002. Rethinking the role of many plant phenolics—protection from photodamage not herbivores? *Oikos* 99(1): 166-172.

Corbo, M., Speranza, B., Campaniello, D., D'Amato, D. y Sinigaglia, M. 2010. Fresh-cut fruits preservation: current status and emerging technologies. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Formatex Research Center, Badajoz: 1143-1154.

Corrales-García, J. y Tlapa-Rangel, C. 1999. Daños por frío y producción de etanol en aguacate (*Persea americana* Mill.) cv Hass. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 345-351.

Croft, K. P., Juttner, F. y Slusarenko, A. J. 1993. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiology* 101(1): 13-24.

Croteau, R., Kutchan, T. M. y Lewis, N. G. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* pp.

Christensen, L. P., Edelenbos, M. y Kreuzmann, S. (2007). *Fruits and vegetables of moderate climate. 7. Flavours and Fragrances*, Springer: 135-187 pp.

Díaz de León-Sánchez, F., Pelayo-Zaldívar, C., Rivera-Cabrera, F., Ponce-Valadez, M., Ávila-Alejandre, X., Fernández, F. J., Escalona-Buendía, H. B. y Pérez-Flores, L. J. 2009. Effect of refrigerated storage on aroma and alcohol dehydrogenase activity in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 54(2): 93-100.

Dicke, M. 2009. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant, Cell & Environment* 32(6): 654-665.

Dudareva, N., Pichersky, E. y Gershenzon, J. 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology* 135(4): 1893-1902.

El-Tarabily, K. A. y Sivasithamparam, K. 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience* 47(1): 25-35.

Espinoza, J. A., Sandoval, C. y Lolas, M. 2012. Evaluación de la efectividad de un fungicida con ingrediente activo boscalid en el control de *Alternaria alternata* Y *Colletotrichum* sp. en tomate industrial.

Facundo, H. V. d. V., Garruti, D. d. S., Dias, C. T. d. S., Cordenunsi, B. R. y Lajolo, F. M. 2012. Influence of different banana cultivars on volatile compounds during ripening in cold storage. *Food Research International* 49: 626–633.

Fall, R., Karl, T., Hansel, A., Jordan, A. y Lindinger, W. 1999. Volatile organic compounds emitted after leaf wounding: On- line analysis by proton- transfer-reaction mass spectrometry. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* (1984–2012) 104(D13): 15963-15974.

FAO. 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FAOSTAT. 2014. Estadísticas de Agricultura de la FAO.

Félix-Gastélum, R. y Gálvez-Figueroa, C. 2002. Control del moho negro, *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) en el fruto del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) considerando unidades de calor y variables ambientales para la aplicación de Azoxystrobin en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 72-76.

Fernando, W. G. D. y Nawalage, V. (2011). Bacterial, fungal, and plant volatile compounds in reducing plant pathogen inoculums. 13. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management*. D. K. Maheshwari, Springer Berlin Heidelberg: 301-319 pp.

French, E. R. y Hebert, T. T. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. San José, Costa Rica, IICA: 168–185 pp.

Gao, H., Zhu, H., Shao, Y., Chen, A., Lu, C., Zhu, B. y Luo, Y. 2008. Lycopene accumulation affects the biosynthesis of some carotenoid- related volatiles independent of ethylene in tomato. *Journal of Integrative Plant Biology* 50(8): 991-996.

Guzmán-Piedrahita, O., Castaño-Zapata, J. y Villegas-Estrada, B. 2009. Diagnóstico de enfermedades de plantas de origen biótico. *Agronomía* 17(2): 7-24.

Herzog, L., Rista, L., Sillon, M., Herzog, G. y Hecklein, M. 1998. *Alternaria Solani* en Tomate bajo Invernaderos: Relación entre Número de Esporas, Enfermedad Potencial y Monocultivo. *FAVE* 12(1): 49-55.

Huang, J., Cardoza, Y., Schmelz, E., Raina, R., Engelberth, J. y Tumlinson, J. 2003. Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. *Planta* 217(5): 767-775.

Hussaini, H., Sani, A. y Aliero, A. 2011. Volatile metabolites profiling to discriminate diseases of tomato fruits inoculated with three toxigenic fungal pathogens. *Research in Biotechnology* 2(3): 14-22.

Hyakumachi, M. y Kubota, M. 2004. Fungi as plant growth promoter and disease suppressor. *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications* 21: 101-110.

Ishida, B. K., Baldwin, E. A., Buttery, R. G., Chui, S. H. y Ling, L. C. 1993. Flavor volatiles, sugars and color development in ripening in vitro- cultured tomato fruit and calyx. *Physiologia Plantarum* 89(4): 861-867.

Jansen, R., Wildt, J., Kappers, I., Bouwmeester, H., Hofstee, J. y Van Henten, E. 2011. Detection of diseased plants by analysis of volatile organic compound emission. *Annual Review of Phytopathology* 49: 157-174.

Jansen, R. M., Miebach, M., Kleist, E., Van Henten, E. J. y Wildt, J. 2009. Release of lipoxygenase products and monoterpenes by tomato plants as an indicator of *Botrytis cinerea*-induced stress. *Plant Biology* 11(6): 859-868.

Jiménez, G. S., Ducoing, H. P. y Sosa, M. R. 2004. LA PARTICIPACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN LA DEFENSA DE LAS PLANTAS *Revista Mexicana de Fitopatología*, diciembre, año/vol. 21, número 003 Sociedad Mexicana de Fitopatología, AC Ciudad Obregón, México.

Jones, J. B. 2001. *Plagas y enfermedades del tomate*, Mundi-Prensa Libros: 1-15 pp.

Jordan, M. J., Margaria, C. A., Shaw, P. E. y Goodner, K. L. 2002. Aroma active components in aqueous kiwi fruit essence and kiwi fruit puree by GC-MS and multidimensional GC/GC-O. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(19): 5386-5390.

Kalia, A. y Gupta, R. P. 2006. *Fruit microbiology. Handbook of fruits and fruit processing*: 1.

Karlshoj, K. N., PV Larsen, TO 2007. Prediction of *Penicillium expansum* spoilage and patulin concentration in apples used for apple juice production by electronic nose analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(11): 4289-4298.

Kessler, A. y Baldwin, I. T. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291(5511): 2141-2144.

Knudsen, J. T., Tollsten, L. y Bergström, L. G. 1993. Floral scents. A checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry* 33(2): 253-280.

Koch, E., Meier, B. M., Eiben, H.-G. y Slusarenko, A. 1992. A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic pseudomonads. *Plant Physiology* 99(2): 571-576.

Kombrink, E. y Somssich, I. E. 1995. Defense responses of plants to pathogens. *Advances in botanical research* 21: 1-34.

Koornneef, A. y Pieterse, C. M. 2008. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology* 146(3): 839-844.

Korpi, A., Järnberg, J. y Pasanen, A.-L. 2009. Microbial volatile organic compounds. *Critical Reviews in Toxicology* 39(2): 139-193.

Krumbein, A., Peters, P. y Brückner, B. 2004. Flavour compounds and a quantitative descriptive analysis of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) of different cultivars in short-term storage. *Postharvest Biology and Technology* 32(1): 15-28.

Lamanaka, B., Teixeira, A., Teixeira, A., Vicente, E., Frisvad, J., Taniwaki, M. y Bragagnolo, N. 2014. Potential of volatile compounds produced by fungi to influence sensory quality of coffee beverage. *Food Research International* 4(5): 661-672.

Lee, S., Kim, H., Choi, G., Lee, H., Jang, K., Choi, Y. y Kim, J. C. 2009. Mycofumigation with *Oxyporus latemarginatus* EF069 for control of postharvest apple decay and *Rhizoctonia* root rot on moth orchid. *Journal of applied microbiology* 106(4): 1213-1219.

Li, C., Krewer, G. W., Ji, P., Scherm, H. y Kays, S. J. 2010. Gas sensor array for blueberry fruit disease detection and classification. *Postharvest biology and technology* 55(3): 144-149.

Li, W., Hartung, J. S. y Levy, L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66(1): 104-115.

Loughrin, J. H., Hamilton-Kemp, T. R., Andersen, R. A. y Hildebrand, D. F. 1990. Headspace compounds from flowers of *Nicotiana tabacum* and related species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38(2): 455-460.

Lucier, G. 2011. *Vegetables and Melons Situation and Outlook Yearbook*, USDApp.

Macías-Sámano, J. (2001). *Mediación semioquímica entre insectos descortezadores y coníferas 12. Interacciones químicas entre organismos. Aspectos Básicos y perspectivas de su aplicación México, Colegio de la Frontera Sur: 459-503 pp.*

Maffei, M. E., Gertsch, J. y Appendino, G. 2011. Plant volatiles: production, function and pharmacology. *Natural Product Reports* 28(8): 1359-1380.

Mahovic, M., Sargent, S., Bartz, J. y Kan, E. 2002. Identificación y control postcosecha de las enfermedades del tomate en la Florida. *Plant Pathology Department, Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.*

Makkar, H. P., Siddhuraju, P. y Becker, K. 2007. *Plant secondary metabolites*, Humana Presspp.

Marín-Loaiza, J. C. y Céspedes, C. L. 2007. Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Revista Fitotecnia Mexicana(004): 327-351.*

Maróstica M. R, G. M. P. 2007. *Flavours and fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability.*, Springer: 189–200 pp.

Martínez, J. R., Vicente, A. A., Saenz, J. C. M., Herrera, R. R. y González, C. N. A. 2012. Un tesoro percedero en México: El tomate, tecnologías para prolongar su vida de anaquel. *Investigación y Ciencia: Universidad Autónoma de Aguascalientes(54): 57-63.*

Maul, F., Sargent, S., Sims, C., Baldwin, E., Balaban, M. y Huber, D. 2000. Tomato flavor and aroma quality as affected by storage temperature. *Journal of Food Science* 65(7): 1228-1237.

McCaskill, D. y Croteau, R. (1997). Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis. *Biotechnology of aroma compounds*. T. Sheper. Washington State University, Springer. 55: 107-146 pp.

McCaskill, D. y Croteau, R. 1998. Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *Trends in Biotechnology* 16(8): 349-355.

Mercier, J. y Manker, D. C. 2005. Biocontrol of soil-borne diseases and plant growth enhancement in greenhouse soilless mix by the volatile-producing fungus *Muscodor albus*. *Crop Protection* 24(4): 355-362.

Moalemiyan, M., Vikram, A. y Kushalappa, A. 2007. Detection and discrimination of two fungal diseases of mango (cv. Keitt) fruits based on volatile metabolite profiles using GC/MS. *Postharvest Biology and Technology* 45(1): 117-125.

Morath, S. U., Hung, R. y Bennett, J. W. 2012. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews* 26(2): 73-83.

Müller, A., Faubert, P., Hagen, M., zu Castell, W., Polle, A., Schnitzler, J.-P. y Rosenkranz, M. 2013. Volatile profiles of fungi—chemotyping of species and ecological functions. *Fungal Genetics and Biology* 54: 25-33.

Nieminen, T., Neubauer, P., Sivelä, S., Vatamo, S., Silfverberg, P. y Salkinoja-Salonen, M. 2008. Volatile compounds produced by fungi grown in strawberry jam. *LWT-Food Science and Technology* 41(10): 2051-2056.

Ojeda-Contreras, A. J., Hernández-Martínez, J., Dominguez, Z., Mercado-Ruiz, J. N., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A. y Tiznado-Hernández, M. E. 2008. Utilization of caffeic acid phenethyl ester to control *Alternaria alternata* rot

in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Journal of Phytopathology* 156(3): 164-173.

Ortiz-Serrano, P. y Gil, J. V. 2007. Quantitation of free and glycosidically bound volatiles in and effect of glycosidase addition on three tomato varieties (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* 55(22): 9170-9176.

Pagot, Y., Belin, J.-M., Husson, F. y Spinnler, H.-E. 2007. Metabolism of phenylalanine and biosynthesis of styrene in *Penicillium camemberti*. *Journal of Dairy Research* 74(02): 180-185.

Paré, P. W. y Tumlinson, J. H. 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology* 121(2): 325-332.

Park, M. S., Choi, G. J. y Jang, K. S. 2010. Potential of the volatile-producing fungus *Nodulisporium* sp. CF016 for the control of postharvest diseases of apple. *The Plant Pathology Journal* 26(3): 253-259.

Peñalver Hernando, A. M. 2002. Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental.

Peñuelas, J. y Llusà, J. 2004. Plant VOC emissions: making use of the unavoidable. *Trends in Ecology & Evolution* 19(8): 402-404.

Pesis, E. y Marinansky, R. 1990. Volatile production induced by *Penicillium digitatum* in orange fruit and in culture. *Journal of phytopathology* 128(4): 306-314.

Pichersky, E. y Gershenzon, J. 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current opinion in plant biology* 5(3): 237-243.

Polizzi, V., Adams, A., Malysheva, S. V., De Saeger, S., Van Peteghem, C., Moretti, A., Picco, A. M. y De Kimpe, N. 2012. Identification of volatile markers

for indoor fungal growth and chemotaxonomic classification of *Aspergillus* species. *Fungal Biology* 116(9): 941-953.

Pontón, J., Moragues, M. D., Guarro, J., Quindós, G. y Gené, J. 2002. Hongos y actinomicetos alergénicos. España, *Revista Iberoamericana de Micología* pp.

Prithiviraj, B., Vikram, A., Kushalappa, A. y Yaylayan, V. 2004. Volatile metabolite profiling for the discrimination of onion bulbs infected by *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum* and *Botrytis allii*. *European Journal of Plant Pathology* 110(4): 371-377.

Pryor, B. M. y Gilbertson, R. L. 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research* 104(11): 1312-1321.

Rambla, J. L., Tikunov, Y. M., Monforte, A. J., Bovy, A. G. y Granell, A. 2014. The expanded tomato fruit volatile landscape. *Journal of experimental botany*: eru128.

Reddy, G., Holopainen, J. y Guerrero, A. 2002. Olfactory responses of *Plutella xylostella* natural enemies to host pheromone, larval frass, and green leaf cabbage volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 28(1): 131-143.

Reineccius, G. 2004. *Flavor chemistry and technology*, CRC presspp.

Roberts, R., Reymond, S. y Andersen, B. 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research* 104(2): 151-160.

Rodriguez-Saona, C. (2012). La Ecología Química de Interacciones Tri-Tróficas. 315-342. *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*. J. C. R. y E. A. M. (eds.). El colegio de la Frontera Sur: 315-342 pp.

Rostás, M., Ton, J., Mauch-Mani, B. y Turlings, T. C. 2006. Fungal infection reduces herbivore-induced plant volatiles of maize but does not affect native parasitoids. *Journal of Chemical Ecology* 32(9): 1897-1909.

Ruiz-Ruiz, S., Ambrós, S., Vives, M. d. C., Navarro, L., Moreno, P. y Guerri, J. 2009. Detection and quantitation of Citrus leaf blotch virus by TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 160(1): 57-62.

Salas, J. J. 2004. Characterization of alcohol acyltransferase from olive fruit. *Journal of agricultural and food chemistry* 52(10): 3155-3158.

Salas Salazar, N. A., Molina Corral, F. J., Berlanga Reyes, D. I., Romo Chacón, A. y Olivas, G. I. 2011. La fecha de cosecha y la síntesis de compuestos volátiles en frutos almacenados de manzanos 'golden delicious'/'red delicious'. *Revista Fitotecnia Mexicana* 34(4): 257-267.

Sankaran, S., Mishra, A., Ehsani, R. y Davis, C. 2010. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Computers and Electronics in Agriculture* 72(1): 1-13.

Sanz, L., Perez, A. y Olias, J. 1992. La lipoxigenasa en el reino vegetal. II: Funciones fisiológicas asignadas. *Grasas y aceites* 43(5): 287-290.

Sarry, J.-E. y Günata, Z. 2004. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chemistry* 87(4): 509-521.

Schuchardt, S. y Kruse, H. 2009. Quantitative volatile metabolite profiling of common indoor fungi: relevancy for indoor air analysis. *Journal of Basic Microbiology* 49(4): 350-362.

Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R. y Lewinsohn, E. 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal* 54(4): 712-732.

Schwarze, F. W., Engels, J. y Mattheck, C. (2000). Fungal strategies of wood decay in trees. Alemania, Springer: 33-124 pp.

Shimada, T., Endo, T., Fujii, H., Hara, M. y Omura, M. 2005. Isolation and characterization of (E)-beta-ocimene and 1, 8 cineole synthases in Citrus unshiu Marc. Plant science 168(4): 987-995.

Snell, K., Draths, K. y Frost, J. 1996. Synthetic modification of the Escherichia coli chromosome: enhancing the biocatalytic conversion of glucose into aromatic chemicals. Journal of the American Chemical Society 118(24): 5605-5614.

Snowdon, A. L. 2010. Post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables: Volume 2: Vegetables, Manson Publishingpp.

Suslow, T. V. y Cantwell, M. 2000. Recomendaciones para Mantener la Calidad Post Cosecha. Department of Vegetable Crops, University of California, Davis, CA95616.

Tamayo Molano, P. y Jaramillo Noreña, P. 2006. Enfermedades del tomate, pimentón, aji y berenjena en Colombia: guía para su diagnóstico y manejo.

Tandon, K., Baldwin, E., Scott, J. y Shewfelt, R. 2003. Linking sensory descriptors to volatile and nonvolatile components of fresh tomato flavor. Journal of Food Science 68(7): 2366-2371.

Tieman, D. M., Loucas, H. M., Kim, J. Y., Clark, D. G. y Klee, H. J. 2007. Tomato phenylacetaldehyde reductases catalyze the last step in the synthesis of the aroma volatile 2-phenylethanol. Phytochemistry 68(21): 2660-2669.

Tikunov, Y., Lommen, A., de Vos, C. R., Verhoeven, H. A., Bino, R. J., Hall, R. D. y Bovy, A. G. 2005. A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles. Plant Physiology 139(3): 1125-1137.

Troncoso- Rojas, R., Sánchez- Estrada, A., Ruelas, C., Garcia, H. S. y Tiznado- Hernández, M. 2005. Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by Alternaria alternata. Journal of the Science of Food and Agriculture 85(9): 1427-1434.

Turlings, T. C. y Wäckers, F. 2004. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. *Advances in insect chemical ecology* 2: 21-75.

Van Den Boom, C. E., Van Beek, T. A., Posthumus, M. A., De Groot, A. y Dicke, M. 2004. Qualitative and quantitative variation among volatile profiles induced by *Tetranychus urticae* feeding on plants from various families. *Journal of chemical ecology* 30(1): 69-89.

Vickers, C. E., Gershenzon, J., Lerdau, M. T. y Loreto, F. 2009. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature Chemical Biology* 5(5): 283-291.

Vidhyasekaran, P. 2010. *Fungal Pathogenesis in Plants and Crops: Molecular Biology and Host Defense Mechanisms*, CRC Press: 55 pp.

Vuorinen, T., Reddy, G., Nerg, A.-M. y Holopainen, J. K. 2004. Monoterpene and herbivore-induced emissions from cabbage plants grown at elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration. *Atmospheric Environment* 38(5): 675-682.

Yilmaz, E. 2001. Oxylin pathway in the biosynthesis of fresh tomato volatiles. *Turkish Journal of Biology* 25: 351-360.

Zangerl, A. y Berenbaum, M. 2009. Effects of florivory on floral volatile emissions and pollination success in the wild parsnip. *Arthropod-Plant Interactions* 3(3): 181-191.

Zarate, S. I., Kempema, L. A. y Walling, L. L. 2007. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiology* 143(2): 866-875.