



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

**INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A *Botrytis cinerea* EN UVA DE
MESA (*Vitis vinifera*) MEDIANTE APLICACIÓN POSCOSECHA
DE OLIGOSACÁRIDOS DE PECTINA**

Por

Jesús Alejandro Tiznado Valenzuela

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

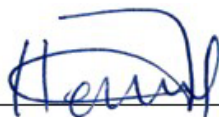
MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Jesús Alejandro Tizado Valenzuela la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias



Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Director de Tesis



M.C. Emmanuel Aispuro Hernández Asesor
Integrante del comité de tesis



Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro Asesor
Integrante del comité de tesis



Dr. José Juan Virgen Ortiz
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Inducción de Resistencia a *Botrytis cinerea* en Uva de Mesa (*Vitis vinifera*) Mediante Aplicación Poscosecha de Oligosacáridos de Pectina” 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 Jesús Alejandro Tiznado Valenzuela, 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 de quien ocupe la titularidad de la Dirección 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 manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACION EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT, por el apoyo brindado a lo largo de la maestría

A CIAD, por permitirme formar parte del programa de posgrado

A mi madre y a mi padre, por todo el apoyo, las porras, los consejos y los regaños que me impulsaron a lo largo de este camino

A José María Gastellum, por siempre estar ahí para todas las quejas durante las clases y los exámenes, y por todos los consejos relacionados con mi proyecto. Y por supuesto, por tu amistad.

Al Dr. Miguel Ángel y al M.C. Emmanuel, por la guía a lo largo de todo este proyecto, y por todas las enseñanzas, no sólo a nivel académico, sino a nivel profesional e incluso personal.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
CONTENIDO	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE CUADROS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	13
2.1. Generalidades de la Uva	13
2.1.1. Importancia Económica de la Uva.....	13
2.1.2. Parámetros de Calidad de la Uva.....	13
2.1.3. Pérdida o Desperdicio de la Uva de Mesa	14
2.2. <i>Botrytis cinerea</i>	14
2.2.1. Generalidades	14
2.2.2. Mecanismo de Infección.....	15
2.2.3. Factores de Virulencia	15
2.3. Mecanismos de Defensa	16
2.3.1. Generalidades	16
2.3.2. Proteínas Relacionadas con Patogénesis (PR).....	17
2.3.3. Vía de Síntesis de Fenilpropanoides	17
2.4. Control Industrial de <i>Botrytis cinerea</i>	18
2.4.1. Actividades Culturales.....	18
2.4.2. Uso de Fungicidas.....	18
2.4.3. Dióxido de Azufre	19
2.4.4. Métodos Alternativos.....	20
2.5. Oligosacáridos de Pectina.....	20
2.5.1. Generalidades	20
2.5.2. Señalización Mediada por Oligosacáridos de Pectina	21
2.5.3. Uso de Oligosacáridos de Pectina.....	22
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivo General.....	24
4.2. Objetivos Específicos	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1. Materiales	25

CONTENIDO (continuación)

5.1.1 Material Vegetal	25
5.1.2. Obtención del Inóculo.....	25
5.1.3 Oligosacáridos de Pectina.....	26
5.2. Métodos	26
5.2.1. Tratamientos	26
5.2.1.1. Aplicación de tratamientos de oligosacáridos de pectina en uvas de mesa para ensayos de calidad, contenido de fenoles totales, y expresión de genes.	26
5.2.1.2. Evaluación del Efecto de los Oligosacáridos de Pectina Sobre la Incidencia de Pudrición Gris Causada por <i>Botrytis cinerea</i> en Racimos de Uva de Mesa.	26
5.2.2 Análisis de Calidad de las Uvas Tratadas.....	27
5.2.2.1. Firmeza.....	27
5.2.2.2. Color.....	27
5.2.2.3. Sólidos solubles totales.	28
5.2.2.4. Determinación de acidez titulable	28
5.2.3. Determinación de Fenoles Totales.....	28
5.2.4. Evaluación del efecto de oligosacáridos de pectina sobre la expresión de genes relacionados con resistencia en uva de mesa	29
5.2.4.1. Aislamiento de RNA total y síntesis de cDNA	29
5.2.4.2. Análisis de expresión de genes mediante RT-qPCR.....	29
5.2.6. Análisis Estadístico.....	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	31
6.1. Análisis de Calidad de Uvas Tratadas	31
6.1.1. Firmeza	31
6.1.2. Color	32
6.1.3. Sólidos Solubles Totales y Acidez Titulable	34
6.2. Fenoles Totales	35
6.3. Resistencia Contra <i>Botrytis cinerea</i>	36
6.3.1. Expresión genética.....	36
6.3.2. Incidencia de Infección.....	39
7. CONCLUSIONES.....	41
8. RECOMENDACIONES.....	42
9. REFERENCIAS	43
10. ANEXOS	48
10.1. Análisis Preliminares de Calidad de Uvas de Mesa cv. Perlette Cosechadas en Junio 2019 tras la Aplicación de Distintas Concentraciones de OSP.....	48
10.2. Validación de <i>STS</i>	51

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Firmeza de uvas de mesa variedad Perlette durante almacenamiento a 4°C y 90% HR, tratadas con oligosacáridos de pectina de 3-20 GP en dosis de 1, 5 y 9 g/L.....	21
2	Cambios en el color de uva de mesa variedad Perlette durante el almacenamiento a 4°C y 90% HR por la aplicación de OSP de 3-20 GP en concentraciones de 0, 1, 5 y 9 g/L sobre los parámetros Croma, Hue y Luminosidad.....	23
3	Efecto de la aplicación de oligosacáridos de pectina de 3-20 GP en dosis de 0, 1, 5 y 9 g/L. sobre el contenido de sólidos solubles totales en uvas cv. Perlette almacenadas a 4°C y 90% HR.....	25
4	Efecto de la aplicación de oligosacáridos de pectina de 3-20 GP en dosis de 0, 1, 5 y 9 g/L sobre el contenido de fenoles totales en uva de mesa cv. Perlette almacenadas a 4°C y 90% HR.....	26
5	Expresión de genes relacionados con resistencia a <i>B. cinerea</i> en uva de mesa cv. Perlette durante almacenamiento de 15 días a 4°C y 90% HR.....	28
6	Porcentaje de incidencia de infección de <i>B. cinerea</i> en uva de mesa cv. Perlette durante almacenamiento de 38 días a 4°C y 90% HR.....	29

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Lista de cebadores usados en PCR en tiempo real.....	30

RESUMEN

La uva de mesa es una fruta de importancia económica a nivel mundial; México anualmente produce más de 400 mil toneladas de esta fruta. *Botrytis cinerea* es un hongo necrotrófico que puede permanecer latente durante el desarrollo de las bayas hasta que estas alcanzan su madurez. Para prevenir infecciones en precosecha se utilizan fungicidas sintéticos, así como la aplicación de dióxido de azufre (SO₂) durante el almacenamiento refrigerado en poscosecha. Ambas opciones dejan residuos que pueden afectar la salud de los consumidores, o provocar defectos en el fruto, por lo que se buscan alternativas naturales para prevenir su deterioro durante el almacenamiento. Una alternativa es el uso de oligosacáridos de pectina (OSP) como inductores de respuestas de defensa. Los OSP de 3 a 20 GP (grado de polimerización) han presentado un efecto inductor de la actividad de enzimas glucanasas y quitinasas en frutos de fresa, antecedente con potencial de activar mecanismos de defensa en otros frutos. El objetivo de este trabajo fue el evaluar la inducción de marcadores de defensa contra fitopatógenos al aplicar oligosacáridos de pectina de 3-20 GP (1, 5 y 9 g/L) en uva de mesa variedad Perlette durante almacenamiento a 4°C y 90% HR, así como su efecto sobre la calidad del fruto. No se observaron diferencias significativas en la firmeza, parámetros de color, sólidos solubles totales, acidez titulable ni contenido de fenoles totales en las uvas tratadas con las distintas concentraciones de OSP con respecto al control ($p > 0.05$). Se observó que la aplicación de 5 y 9 g/L de OSP induce el aumento de la expresión de quitinasa (*CHI*) y fenilalanina amonio liasa (*PAL*) durante almacenamiento ($p < 0.05$); sin embargo, no hubo diferencia significativa en la incidencia de infección entre las uvas tratadas con las distintas concentraciones de OSP con respecto al control ($p > 0.05$). En este estudio se observó que, a pesar del incremento en la expresión de genes relacionados con la resistencia contra *B. cinerea*, esto fue insuficiente para aumentar la resistencia del fruto ante el ataque del patógeno.

Palabras claves: oligosacáridos de pectina; fitopatógenos; tratamiento poscosecha; uva de mesa; inducción de genes de resistencia

ABSTRACT

Table grape are an economically important fruit worldwide; Mexico annually produces more than 400 thousand tons of this fruit. *Botrytis cinerea* is a necrotrophic fungus that can remain dormant through the berry development to maturity. To prevent preharvest infections, synthetic fungicides are used, as well as the application of SO₂ during postharvest refrigerated storage. Both options leave residues that can cause defects in the fruit, so natural alternatives are sought to prevent deterioration during storage. One of these is the use of pectin oligosaccharides (OSP) as inducers of defense responses. OSP from 3 to 20 GP have shown an inducing effect on the activity of glucanase and chitinase enzymes in strawberry fruits. The objective of this work is to evaluate the induction of defense markers against phytopathogens when applying OSP of 3-20 GP (1, 5 and 9 g / L) in table grape cv. Perlette during storage at 4 ° C and 90% RH, as well as the effect of OSP application on fruit quality. No significant differences were observed in the firmness, color parameters, total soluble solids, titratable acidity, or total phenol content in the grapes treated with the different concentrations of OSP with respect to the control (p> 0.05). It was observed that the application of 5 and 9 g / L of OSP induce an increase in the expression of chitinase (*CHI*) and phenylalanine-ammonia lyase (*PAL*) during storage (p <0.05). However, there was no significant difference in the incidence of infection between the grapes treated with the different concentrations of OSPs with respect to the control during cold storage (p> 0.05). In this project it was observed that, although there was an increase in the expression of genes related to resistance against *B. cinerea*, this was insufficient to increase the resistance of the fruit to the attack of the pathogen.

Key words: pectin oligosaccharides; phytopathogens; postharvest treatment; table grape; resistance-gene induction

1. INTRODUCCIÓN

En México, el Estado de Sonora es el principal productor de uva de mesa, con una cosecha de más del 70% del total nacional (SIAP, 2019). Este fruto, así como muchos otros, es susceptible al deterioro debido a un manejo inadecuado durante la poscosecha, principalmente por almacenamiento en altas temperaturas, baja humedad relativa, y microorganismos patógenos, entre los cuales *Botrytis cinerea* es el principal agente deteriorativo (FAO, 2019, Dean *et al.*, 2012).

Botrytis cinerea es un hongo necrotrófico capaz de mantenerse latente en las bayas hasta que estas adquieren condiciones de madurez fisiológica, sin alertar a su huésped; también puede sobrevivir largos periodos de tiempo en forma de esclerocios en desechos, como ramas, hojas o raíces viejas y secas (Dewey *et al.*, 2016; Holz *et al.*, 2007). Este hongo destruye las barreras externas del huésped a través de enzimas como cutinasas, endopoligalacturonasas, arabinasas, entre otras, que utiliza para que el apresorio logre penetrar a las células y adquirir nutrientes (van Kan, *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2014; Nafisi *et al.*, 2014).

Para defenderse del ataque de fitopatógenos, patrones moleculares asociados al invasor o al daño causado por este son detectados en la membrana celular por receptores especializados (Cui *et al.*, 2015). Una vez detectado el fitopatógeno, se activan cascadas de señalización mediadas por proteínas-quinasas asociadas a mitógeno; a su vez, se inicia la síntesis de hormonas (Zhang *et al.*, 2012). Todo esto resulta en la activación de mecanismos para enfrentar al patógeno, como la producción de especies reactivas de oxígeno, la producción de metabolitos secundarios por la vía de los fenilpropanoides, o la síntesis de proteínas relacionadas con patogénesis (Sudisha *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2019).

En la industria, el uso de fungicidas durante la precosecha y el uso de dióxido de azufre (SO₂) durante el transporte y almacenamiento de la uva son los métodos más usados para el control de *Botrytis cinerea*. Sin embargo, el uso de estos tratamientos conlleva efectos adversos, como la generación de especies resistentes a fungicidas y pérdida de calidad por exceso de SO₂ (Jacometti *et al.*, 2010; Zoffoli *et al.*, 2008).

Por lo anterior, se ha considerado el uso de métodos alternativos para el control de este patógeno, como el uso de microorganismos competitivos contra *Botrytis* o que logran inducir respuestas de defensa, sin atacar a la planta o al fruto, o mediante el uso de elicitors biológicos, los cuales son

capaces de inducir respuestas de defensa mediante patrones moleculares asociados a patógenos, como oligosacáridos de quitina, o asociados a daño, como los oligosacáridos de pectina (Bolívar-Anillo *et al.*, 2019; van Aubel *et al.*, 2014; Davidsson *et al.*, 2017). Se ha demostrado que el uso de oligosacáridos de pectina logra inducir la expresión genética y actividad de quitinasa, β -1,3-glucanasa y fenilalanina-amonio liasa, así como la reducción de incidencia en la infección de *Botrytis cinerea* en hojas de vid y en fresa durante poscosecha (Aziz *et al.*, 2004; Virgen-Ortiz *et al.*, 2020).

Por lo que en esta investigación se evaluó el efecto de la aplicación poscosecha de oligosacáridos de pectina en la inducción de marcadores moleculares de resistencia a patógenos para reducir el deterioro por infección de *Botrytis cinerea* en uva de mesa variedad Perlette.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de la Uva

2.1.1. Importancia Económica de la Uva

La uva (*Vitis vinifera*) es un fruto no climatérico de alta importancia económica a nivel mundial, que alcanzó una producción global de más de 77 millones de toneladas, de las cuales México produjo 475 mil toneladas (FAO, 2019; SIAP, 2020). De los estados productores de uva, Sonora ocupa el primer lugar, alcanzando el 71% de la producción nacional en 2020 (SIAP, 2020).

La uva de mesa es la que más se produce a nivel mundial. En 2016 se reportó una producción de más de 27 millones de toneladas en el mundo, y un consumo aproximado de más de 20 millones. Ese mismo año, México reportó una producción de 256 mil toneladas, y un consumo de 170 mil toneladas (OIV, 2016).

2.1.2. Parámetros de Calidad de la Uva

Cada país o región tiene sus propias normas y parámetros que indican las características que la uva debe cumplir y en qué categoría puede ser aceptado comercialmente, aunque hay ciertos parámetros, como el grado de deterioro y apariencia general de la fruta, que son características comunes.

La Unión Europea, Estados Unidos y México requieren que todas las uvas estén exentas de daño físico, de infecciones (tanto en la baya como en el raquis), de suciedad, manchas causadas por pérdida de pigmento, además de un contenido de sólidos solubles igual o mayor a 15.5% como indicador de madurez (PROFECO, 1996; USDA, 1999; Codex Alimentarius, 2007).

Los parámetros relacionados con color, textura, sabor, contenido de sólidos solubles, entre otros, serán dictados por la variedad de uva que se esté cosechando, así como las condiciones generales

en las que se desarrolle la planta, como temperatura, disponibilidad de agua, entre otros (Poni *et al.*, 2018).

2.1.3. Pérdida o Desperdicio de la Uva de Mesa

Estudios realizados por la FAO en 2016, señalan que más del 20% de las frutas y vegetales producidos en el mundo son desperdiciados (FAO, 2019). En dicho estudio, las actividades poscosecha, como el empaque, almacenamiento y transporte deficientes son considerados como los principales factores de pérdida alimentaria. Una de las consecuencias del mal manejo de estas actividades es la exposición del producto a condiciones no favorables de conservación, como altas temperaturas, daño mecánico, y el ataque de microorganismos deteriorativos.

2.2. Botrytis cinerea

2.2.1. Generalidades

Botrytis cinerea es un hongo necrotrófico ampliamente distribuido en el mundo, catalogado como uno de los fitopatógenos de mayor importancia industrial (Dean *et al.*, 2012). Una vez que el huésped muere, este hongo puede continuar su vida en forma de un saprófito, es decir, alimentándose del tejido muerto de la fruta. Este hongo puede desarrollarse como un endófito, es decir, puede desarrollarse sin ocasionar síntomas en la fruta y con mínima activación de respuestas por parte del huésped (Dewey *et al.*, 2016).

B. cinerea también puede desarrollar estructuras llamadas esclerocios para sobrevivir por largos periodos de tiempo, ya sea directamente en el suelo, o en desechos de la planta, como ramas, hojas o raíces viejas. Una vez que existan condiciones adecuadas para el desarrollo del hongo, éste empezará a generar inóculo viable. (Holz *et al.*, 2007).

2.2.2. Mecanismo de Infección

B. cinerea puede llegar a un huésped sano a través del aire, después de varios ciclos de generación de inóculo a partir de los esclerocios, o desde otros huéspedes ya infectados. En uva, una de las principales fuentes de inóculo son componentes estructurales de la planta en estado necrótico, como tallos, raquis u hojas, ya que facilitan la sobrevivencia del hongo hasta que tenga mejores condiciones ambientales. La deposición del hongo mediante gotas de agua, generalmente debido a lluvia, acelera la infección de la planta de manera dramática, debido a la alta disponibilidad de agua (Jaspers *et al.* 2013).

La principal ruta de infección de éste patógeno en uva es a través de órganos florales, principalmente el receptáculo; también son rutas de infección el estigma y el estilo, en menor grado. Una vez en el tejido, la humedad relativa y la temperatura serán los principales factores para el óptimo desarrollo del hongo, donde las condiciones más favorables son 15-20°C y más de 90% de humedad relativa (Carisse, 2015).

2.2.3. Factores de Virulencia

El primer paso en la infección de *B. cinerea* una vez en el tejido es la penetración de la cutícula, mediante la segregación de enzimas para la degradación de los lípidos que la conforman, entre las cuales las lipasas extracelulares degradarán la capa cerosa de la cutícula, y las cutinasas destruyen la estructura polimérica de la cutina; durante este proceso el hongo desarrolla una forma especializada en penetrar a las células, llamada apresorio (van Kan, *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2014).

Una vez penetrada la cutícula, el siguiente objetivo es la penetración de la pared celular; de esta manera, también se obtienen nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo del hongo. Para lograr esto, son liberadas enzimas degradadoras de pared celular, entre ellas, endopoligalacturonasas, poligalacturonasas, α -arabinofuranosidasas, xilanasas y arabinasas (Nafisi *et al.*, 2014).

En un estudio realizado por Govrin y colaboradores (2000), se determinó que la respuesta

hipersensible de la planta, en la cual se producen y acumulan especies reactivas de oxígeno con el fin de causar la muerte celular programada, es inducida por *B. cinerea*, lo que facilita el establecimiento de la infección en tejidos afectados. Además, observaron que mutantes deficientes en dicha respuesta fueron menos susceptibles al ataque del patógeno.

2.3. Mecanismos de Defensa

2.3.1. Generalidades

A lo largo del tiempo, las plantas han desarrollado maneras de defenderse de organismos hostiles, como insectos, animales, y microorganismos patógenos, mediante la detección y señalización de patrones moleculares, tanto del atacante como del resultado de la destrucción de componentes celulares (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, o PAMP; Patrones Moleculares Asociados a Daño, o DAMP), seguido de la liberación de compuestos químicos capaces de repeler o destruir a dicho atacante; a dicha respuesta se le llama inmunidad mediada por patrones (PTI) (Cui *et al.*, 2015).

Una vez reconocidos dichos patrones, surge la transducción de señales mediante cascadas de proteínas cinasa activadas por mitógeno (MAPK), las cuales, después de varios pasos de fosforilación, inducirán la síntesis de hormonas necesarias para la posterior traducción de señales de defensa ante el ataque de algún patógeno (Zhang *et al.*, 2012).

Aún si el atacante logra bloquear este mecanismo, y las plantas pueden reconocer las moléculas involucradas en dicho bloqueo, y amplificar la inmunidad mediada por patrones, que generalmente resulta en la muerte de la célula, evento categorizado como respuesta hipersensible. A este fenómeno se le conoce como inmunidad mediada por efectores (ETI), es decir, las moléculas que el patógeno utiliza para el ataque antes descrito (Presti *et al.*, 2015).

La transducción de señales es un evento de suma importancia para que se lleven a cabo los procesos de defensa, principalmente en PTI, ya que derivada de ésta, inician los caminos metabólicos implicados en la síntesis de proteínas relacionadas con patogénesis y metabolitos secundarios, principalmente aquellos derivados de la vía de los fenilpropanoides (Denance *et al.*, 2013).

2.3.2. Proteínas Relacionadas con Patogénesis (PR)

Se trata de proteínas sintetizadas durante el ataque de patógenos en la planta, como parte de la resistencia sistémica adquirida (SAR). Éstas tendrán diferentes roles dependiendo de la clase de proteína de la que se trate; en general todas son enzimas que cumplen un rol en la destrucción de componentes del patógeno, además de inhibir ciertas rutas metabólicas relacionadas con el ataque del patógeno. Algunas de estas son β -1,3-glucanasas, quitinasas, endoproteinasa, peroxidasas y defensinas. Estas proteínas son agrupadas según su función (PR-1 a PR-17) (Sudisha *et al.*, 2012). Durante el ataque de fitopatógenos fúngicos, las quitinasas y las β -1,3-glucanasas son las que tienen mayor efecto, ya que estas actúan sobre componentes de la pared celular de estos organismos y detienen el proceso de infección (Robinson *et al.*, 1997).

2.3.3. Vía de Síntesis de Fenilpropanoides

El metabolismo secundario en plantas es la producción de compuestos fenólicos mediante la conversión de fenilalanina a cinamato a través de la enzima fenilalanina-amonio liasa (PAL), posteriormente transformada en *p*-coumaroil CoA a través de cinamato 4-hidroxilasa y 4-coumaril CoA-ligasa. A partir de este compuesto, se producen varios compuestos bioactivos, algunos de ellos relacionados con la defensa de la planta frente al ataque de patógenos, como lignina, flavonoides, antocianinas, entre otras (Vogt, 2010; Kumar *et al.*, 2019; Shine *et al.*, 2016). La síntesis de compuestos fenilpropanoides ocurre durante la maduración del fruto.

En uvas, la síntesis de flavonoides y antocianinas es acelerada durante el proceso de envero y alcanzan su máxima concentración cuando el fruto es completamente maduro (Zhao *et al.*, 2014). Los estilbenos también son importantes en el perfil de compuestos fenólicos de las uvas, ya que estos, principalmente el E-estilbeno, son sintetizados durante el ataque de fitopatógenos (Błaszczuk *et al.*, 2019).

2.4. Control Industrial de *Botrytis cinerea*

2.4.1. Actividades Culturales

Una de las prácticas más comunes para el control de cualquier enfermedad es la limpieza del campo y de las plantas, con el fin de eliminar cualquier vector o punto de propagación del hongo. Como se mencionó anteriormente, ramas, raíces, u hojas muertas son un excelente medio de crecimiento para *B. cinerea*, por lo que la remoción de estos desechos ayuda significativamente al control de la enfermedad (Jaspers *et al.*, 2013).

El diseño de la plantación también es un factor que puede influir en la incidencia de la infección. Si las plantas tienen suficiente espacio entre ellas, estas podrán recibir más luz y tener mayor flujo de aire, impidiendo que se genere mucha humedad en el dosel (Elad, 2015).

2.4.2. Uso de Fungicidas

El uso de fungicidas es una de las prácticas más comunes en el campo, y generalmente involucrando el uso de agentes tóxicos para el control de enfermedades en plantas. Idealmente, para el buen control de una enfermedad, la presencia de esta debe ser monitoreada constantemente, y aplicar el fungicida, o bien, realizar aplicaciones rutinarias con el fin de no dar oportunidad al patógeno de establecerse en la baya. El realizar estas actividades debe ser registrado siempre, además de ser llevado a cabo utilizando las medidas de seguridad e inocuidad apropiadas (FDA, 2018; SENASICA, 2020).

Una consecuencia derivada del uso excesivo de fungicidas sintéticos es el daño que estos causan al ecosistema. En suelo, estos pueden llegar a ser absorbidos y acumulados; con el paso del tiempo estos pueden llegar a convertirse en compuestos altamente tóxicos, lo que altera sus características físicas, químicas y microbiológicas. El agua puede verse afectada de la misma manera, haciéndola tóxica para consumo humano, animal e incluso para actividades en el campo. El aire, a su vez,

puede arrastrar aerosoles, lo que significa un riesgo para la fauna circundante, e incluso comunidades cercanas (Singh *et al.*, 2017; Dhananjayan *et al.*, 2019). Otra razón importante por la cual se está abandonando el uso de fungicidas sintéticos es por la creciente demanda de productos etiquetados como orgánicos, lo cual restringe significativamente las opciones para el control de plagas (USDA, 2016).

Otro factor muy importante es el creciente número de hongos resistentes a fungicidas, entre los cuales se encuentran algunas variedades de *B. cinerea*, debido a la alta variedad genética y fenotípica, así como la exposición y sobrevivencia a diferentes tipos de pesticidas, lo que dificulta significativamente el control de la enfermedad (Jacometti *et al.*, 2010; Hahn, 2014).

2.4.3. Dióxido de Azufre

El dióxido de azufre (SO₂) es un gas inorgánico, comúnmente utilizado para el control de agentes patógenos como *B. cinerea*. Generalmente es inyectado dentro de los contenedores utilizados para el transporte de uvas (USDA, 2011).

El SO₂ es absorbido por las células de la fruta en forma de SO₃²⁻, y se acumulan en el apoplasto; de esta manera puede migrar hacia el interior de la membrana plasmática, donde podrá interferir en varias rutas metabólicas, como la fotosíntesis y respiración. Asimismo, este gas puede inducir la acumulación de especies reactivas de oxígeno, que a su vez induce la respuesta hipersensible en la célula (Giraud *et al.*, 2012; Considine *et al.*, 2015).

El uso de este gas ha sido ampliamente estudiado a lo largo del tiempo; se ha demostrado que actúa como inductor de genes de respuesta al ataque de patógenos, aumentando la expresión de genes relacionados con proteínas PR, así como la vía de los fenilpropanoides (Duarte-Sierra *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2017). Sin embargo, el uso excesivo y descontrolado de este químico puede llegar a inducir defectos en la fruta, ya sea pérdida de color, o la aparición de rupturas de la cutícula, defectos que impactan negativamente la calidad y vida de anaquel de la uva de mesa (Zoffoli *et al.*, 2008). Es por esto por lo que ha surgido interés en buscar compuestos que, al aplicarlos a la fruta, puedan desarrollar un efecto similar al de este gas (Romanazzi *et al.*, 2016).

2.4.4. Métodos Alternativos

Con el fin de evitar el uso de fungicidas sintéticos por sus efectos dañinos al ecosistema, así como el uso de SO₂ por el deterioro que este ocasiona sobre las bayas debido a su mal manejo, se han buscado alternativas de origen natural. Por ejemplo, se ha propuesto el uso de agentes de biocontrol mediante microorganismos competitivos o capaces de sintetizar compuestos tóxicos para *B. cinerea*. Durante este mecanismo, agentes de control biológico son capaces de inhibir el desarrollo del hongo, mediante estimulación de defensas de la planta, o bien, mediante la competencia por nutrientes. Habitualmente, organismos endofíticos (que pueden habitar al huésped sin ocasionarle daño) son los que pueden llevar a cabo esta tarea. Algunos ejemplos de estos microorganismos son *Bacillus subtilis*, *Trichoderma atroviride*, *Pseudomonas syringae* y *Aureobasidium pullulans* (Bolívar- Anillo *et al.*, 2019).

Otra alternativa es la aplicación de compuestos capaces de inducir respuestas de defensa en la planta. Generalmente estos son hormonas presentes en la señalización de defensa, moléculas que conforman la pared celular del patógeno, o incluso componentes de la pared celular de la misma planta. Jia y colaboradores (2015), demostraron que la aplicación de MeJA a frutos de fresa y uva mejoró su respuesta al ataque de *B. cinerea*, debido al aumento de la concentración de compuestos fenólicos y proteínas PR. Aziz y colaboradores (2003) observaron que, al aplicar laminarina, un polisacárido obtenido del alga *Laminaria digitata*, aumentó la actividad enzimática de quitinasa y β -1,3- glucanasa, además se redujo la infección de *B. cinerea* en un 55%, en suspensiones celulares y plántulas de vid.

2.5. Oligosacáridos de Pectina

2.5.1. Generalidades

Los oligosacáridos de pectina (OSP) son componentes oligoméricos de dicha estructura polimérica,

usualmente generados por la destrucción de la pared celular durante el ataque de patógenos mediante enzimas con actividad poligalacturonasa. Durante el ataque de *B. cinerea*, estos son ampliamente generados al momento en que el hongo penetra la pared celular.

La pectina está conformada principalmente por homogalacturonano, un polímero formado por residuos de ácido α -D-galacturónico unidos por enlace 1,4, y constituye hasta el 80% de la estructura final, en dependencia de la especie. Su función dentro de la red péctica es dar la estructuralineal a la matriz, así como a otras macromoléculas pécticas, como xilogalacturonanos o apiogalacturonanos (Patova *et al.*, 2014).

2.5.2. Señalización Mediada por Oligosacáridos de Pectina

Como se mencionó anteriormente, la defensa de plantas contra patógenos puede ser iniciada mediante el reconocimiento de patrones moleculares, sean aquellos asociados al patógeno, o aquellos provenientes de la degradación de estructuras celulares, como es el caso de OSP. En general, OSP inducirán vías de señalización mediante cinasa asociadas a pared celular (WAK), unidas a la fracción péctica. Estas son liberadas mediante la acción de pectinasas. En respuesta a la presencia de pectina, WAK activa a la proteína MPK3, que induce la expansión celular. Sin embargo, cuando WAK es activada por fragmentos de pectina, ésta activará a MPK3 y MPK6, lo que inducirá la señalización de respuesta a estrés. La activación de esta vía resulta en la producción de especies reactivas de oxígeno, activación de genes de respuesta, la deposición de calosa, y un aumento en la concentración de calcio en citosol (Choi y Klessig, 2016; Kohorn y Kohorn, 2012). Es importante resaltar que los OSP deben de sufrir cambios para que estos puedan ser activos en la transducción de señales, y deben de ser lo suficientemente largos: aquellos con un grado de polimerización entre 9 y 20 son idóneos, ya que oligómeros de esta longitud forman estructuras tipo “caja de huevo” más estables, aunque OSP de menos de 9 GP también pueden cumplir con la transducción de señales. Estas estructuras se unirán a WAK una vez ensambladas. Para tener un efecto sobre la inducción de señales, los OSP deben conjugarse por medio de calcio (Vidhyasekaran, 2014).

Davidsson y colaboradores (2017) evaluaron el efecto de la aplicación de oligogalacturónidos

cortos de 3 GP en *Arabidopsis thaliana* con el fin de evaluar la expresión de genes de defensa relacionados con el ataque de patógenos necrotroficos; encontraron que inducen la expresión de dichos genes, sin embargo, demostraron que no hay expresión de genes relacionados con la acumulación de especies reactivas de oxígeno, a diferencia de la aplicación de oligogalacturónidos largos.

2.5.3. Uso de Oligosacáridos de Pectina

Aziz, Heynaurd y Lambert (2004) observaron que la aplicación de 0.5 mg/mL de oligogalacturónidos en células de vid inducen la expresión de quitinasa y β -1,3-glucanasa, la producción de especies reactivas de oxígeno, y una reducción de infección por *B. cinerea* de hasta 65% en hojas de vid. van Aubel y colaboradores (2014) utilizaron una mezcla de oligogalacturónidos y quitosano en uva y pepino y observaron su comportamiento ante el ataque de *Erysiphe necator*, y observaron que hubo una reducción significativa en la incidencia y severidad de la infección en ambas frutas.

También se ha estudiado el efecto de oligosacáridos de pectina en la inducción de resistencia a estrés ante el ataque del hongo, así como a estrés abiótico. Virgen-Ortiz y colaboradores (2019) observaron que, al aplicar oligosacáridos de pectina en frutos de fresa, aumentó la actividad de quitinasa, β -1,3-glucanasa y fenilalanina-amonió liasa, así como la concentración de fenoles totales y antocianinas. Además, se observó un retraso en el deterioro de la fruta.

3. HIPÓTESIS

La aplicación poscosecha de oligosacáridos de pectina en uva de mesa variedad Perlette inducirá cambios en la expresión de genes relacionados con la defensa contra fitopatógenos e incrementará su resistencia al ataque de *Botrytis cinerea* durante la poscosecha.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la aplicación poscosecha de oligosacáridos de pectina en la inducción de marcadores moleculares de resistencia a patógenos, para reducir el deterioro por infección de *Botrytis cinerea* en uva de mesa variedad Perlette.

4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar los parámetros de calidad de uva de mesa cv. Perlette posterior a la aplicación de oligosacáridos de pectina de grado de polimerización 3 a 20, particularmente la firmeza, el color, el contenido de sólidos solubles y de la acidez titulable de las bayas.
- Examinar el cambio en el contenido de fenoles totales en el epicarpio de las uvas después de ser tratadas con oligosacáridos de pectina.
- Determinar cambios en la expresión de genes relacionados con resistencia en vid, como quitinasa IV, β -1,3-glucanasa y fenilalanina-amonio liasa por efecto de la aplicación de oligosacáridos de pectina, siendo los genes de interés.
- Evaluar durante poscosecha la reducción de la infección de *Botrytis cinerea* en uvas de mesa posterior a la aplicación de oligosacáridos de pectina.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1 Material Vegetal

Uvas de mesa variedad Perlette fueron obtenidas el día de cosecha en el viñedo “Don Elías”, ubicado en el municipio de San Miguel de Horcasitas, Sonora, México (29° 24' 53.8" N, 110° 48' 12.5" O), empacadas en bolsas de polietileno de baja densidad. Estas fueron almacenadas a 4°C y 95% de humedad relativa (HR) durante todo el experimento.

5.1.2. Obtención del Inóculo

Se obtuvo a partir de una cepa de *Botrytis cinerea* (ATCC 48339) donada por el Laboratorio de Ecología Química de CIAD, A. C., y se propagó mediante su siembra en placas de agar papa dextrosa que se incubó durante 9 días a 25°C. El micelio desarrollado fue resembrado en agar papa dextrosa, y se incubó a 25°C.

Una vez desarrollado el hongo, se agregó a la placa 5 mL de agua destilada con 0.01% de Tween 80 al 0.02%, y se raspó con una varilla de vidrio estéril. El inóculo se recolectó en un matraz Erlenmeyer, filtrando con una gasa estéril para eliminar el micelio; una vez filtrado, el inóculo se centrifugó a 5000 g y posteriormente se homogeneizó en agua destilada con 0.01% de Tween 80 al 0.02% hasta obtener una concentración de 1×10^6 esporas por mL en cámara de Neubauer (Campa-Siqueiros *et al.*, 2017).

5.1.3 Oligosacáridos de Pectina

Para este proyecto se utilizó una mezcla de oligosacáridos de pectina de 3 a 20 GP, obtenida previamente en el laboratorio de Fisiología Vegetal por el método descrito por Vera-Guzmán y colaboradores (2017).

5.2. Métodos

5.2.1. Tratamientos

5.2.1.1. Aplicación de tratamientos de oligosacáridos de pectina en uvas de mesa para ensayos de calidad, contenido de fenoles totales, y expresión de genes. Las bayas de cultivar Perlette previamente descritas fueron separadas en cuatro grupos con el mismo número de racimos quitando aquellos que presentaron daños o defectos en sus bayas, correspondientes a las concentraciones de oligosacáridos de pectina utilizadas para el experimento, de 1, 5, y 9 g/L, así como el control que consistió en agua destilada. Los tratamientos se aplicaron mediante aspersión, sobre 390 gramos de uva en racimos previamente inspeccionados y desinfectados con hipoclorito de sodio al 2%, para asegurar que estén libres de infecciones o daños visibles. Una vez secas las frutas se almacenaron en envases cerrados a 4°C y 90% HR. Se realizaron muestreos a los 0, 1, 3, 5, 10, y 15 días después de la aplicación de los tratamientos.

5.2.1.2. Evaluación del efecto de los oligosacáridos de pectina sobre la incidencia de pudrición gris causada por *Botrytis cinerea* en racimos de uva de mesa. Por cada unidad experimental, se utilizó un racimo con 10 bayas libres de lesiones e infecciones visibles, desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2% por inmersión durante 5 minutos. Una vez desinfectadas, se les administraron los tratamientos de oligosacáridos de pectina (1, 5 y 9 g/L), así como agua estéril como tratamiento control, y se dejaron secar.

Con un bisturí estéril, se hizo una punción sobre la baya, cerca del pedúnculo, y se inoculó mediante aspersión de 5 mL de solución de 1×10^6 esporas. Cada racimo fue almacenado en una caja de plástico, dentro de una cámara de refrigeración a 4°C y 90% de humedad relativa durante 38 días, y las observaciones se realizaron primero a los días 1, 3, 5, 10, 15 y 20 posteriores a inoculación, y después cada dos días, cuantificando el número de bayas con presencia de pudrición gris (Campa-Siqueiros *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de incidencia, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{Uvas con síntomas}}{\text{Total de Uvas}} \times 100$$

5.2.2 Análisis de Calidad de las Uvas Tratadas

5.2.2.1. Firmeza. Veinticinco bayas por tratamiento fueron seleccionadas para ser analizadas con un equipo FirmTech2 (Bioworks, KS, EUA). Los datos obtenidos representan la fuerza necesaria para deformar 1 mm de la baya expresado como gramos fuerza por milímetro (g/mm). Se reporta el porcentaje de firmeza promedio de cada muestra.

5.2.2.2. Color. Se seleccionaron 25 bayas por tratamiento para ser analizadas con un colorímetro (CR-300, Minolta, Japón) equipado con un iluminador D65. Los parámetros analizados fueron luminosidad (L^*), coordenadas rojo/verde (a^*) y coordenadas amarillo/azul (b^*). Los resultados se expresaron como valores L^* , croma (C^* ; 1) y tono (h^* ; 2)), estos dos últimos obtenidos utilizando las siguientes ecuaciones:

$$C^* = (a^2 + b^2)^{1/2} \quad (1)$$

$$h^* = \arctan(b^*/a^*) \quad (2)$$

5.2.2.3. Sólidos solubles totales. Diez bayas por cada tratamiento fueron maceradas y filtradas, con el fin de obtener su jugo. Una vez obtenido, se determinó su contenido de sólidos solubles totales mediante un refractómetro digital Pocket Refractometer Pal-1 (Atago, Japón), y los resultados se expresaron como grados Brix (°Brix).

5.2.2.4. Determinación de acidez titulable. Quince gramos de uva por cada tratamiento fueron licuados con 50 mL de agua neutra. A partir de la mezcla licuada se obtuvieron 50 mL. Las muestras fueron analizadas utilizando un sistema de titulación automática DL21 (Mettler Toledo, OH, EUA), neutralizando el ácido con NaOH 0.1 N hasta llegara un pH de 8.2. Los resultados obtenidos se expresaron como gramos de equivalentes de ácido tartárico por cada 100 gramos de tejido fresco

5.2.3. Determinación de Fenoles Totales

Para la determinación de fenoles totales, se obtuvieron 2 g de epicarpio de uva por cada tratamiento, los cuales fueron homogeneizados con 4 mL metanol grado reactivo al 80% (Sigma-Aldrich). Posteriormente, las muestras se llevaron a baño ultrasónico (Branson 1510, Branson Ultrasonics, CT, EUA) por 30 minutos, para después centrifugarse por 15 minutos a 14000 RPM en refrigeración a 4°C (Sorvall RC5 Plus, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), y recuperar el sobrenadante. El pellet residual es tratado nuevamente; el sobrenadante recuperado se incorpora con el anterior, y se afora a 8 mL.

Una vez obtenidos los extractos, se mezclan 0.50 mL del extracto con 0.125 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N y 3.125 mL de agua destilada, y se deja reposar por 5 minutos; posteriormente se agregan 0.750 mL de solución acuosa de carbonato de sodio al 20% y 0.950 mL de agua destilada. La mezcla se deja reposar durante 30 minutos en oscuridad a 23°C, y se mide absorbancia a 765 nm en espectrofotómetro (Shimadzu UV Spectrophotometer 1700). Los resultados se expresan como mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de cáscara de uva en peso fresco (Singleton y Rossi, 1965).

5.2.4. Evaluación del Efecto de Oligosacáridos de Pectina sobre la Expresión de Genes Relacionados con Resistencia en Uva de Mesa

5.2.4.1. Aislamiento de RNA total y síntesis de cDNA. A partir de 0.2 g de epicarpio de uva previamente congelado con NO₂ líquido y molido se extrajo el RNA total, siguiendo la metodología reportada por Ford y colaboradores (2008), con algunas modificaciones. Una vez obtenido el material genético, éste fue tratado con DNasa (DNA-free Kit, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

Para verificar la calidad del RNA, se analizó según la relación de absorbancia espectrofotométrica A₂₆₀/280 y A₂₆₀/230 utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Para verificar la integridad, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se observó la integridad de las bandas correspondientes a las fracciones de rRNA 28S y 18S.

Para la síntesis de cDNA, se utilizó el kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.2.4.2. Análisis de expresión de genes mediante RT-qPCR. Para el ensayo de PCR en tiempo real, se utilizaron secuencias de oligonucleótidos de quitinasa (ChiIVC), β-1,3-glucanasa (Glu), fenilalanina-amonio liasa (PAL), y actina (ACT) (Cuadro 1). Las secuencias de CHIT4C, GLU y PAL utilizadas fueron reportadas previamente por Lambert y colaboradores (2013), y la secuencia de ACT por García-Baldenegro y col. (2016). Las secuencias de nucleótidos se pueden observar en el cuadro 1.

Las reacciones de qPCR fueron realizadas por triplicado, en un sistema de PCR en tiempo real StepOne (Applied Biosystem Inc., CA, EUA) de 48 pozos. Cada reacción de 20 µL fue constituida por 20 ng de cDNA, 3 µL de la mezcla de cebadores 5 µM (1.5 µL tanto de la secuencia sentido y la antisentido), 10 µL de reactivo iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, CA, EUA), aforando con agua tratada con DEPC 0.1%. Las condiciones de amplificación fueron a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y a 60°C por 1 minuto.

Los resultados obtenidos se normalizaron con los niveles de expresión de *ACT*, y se calculó el cambio relativo en la expresión de los genes de interés (Livak y Schmittgen, 2001). Los resultados se expresaron como cambios con respecto al tratamiento correspondiente en el día cero.

Cuadro 1. Lista de cebadores usados en PCR en tiempo real.

Gen	No. de Acceso	Sentido (5' – 3')	Antisentido (5' – 3-)
<i>CHIT4C</i>	AY156047	GGCGACGAATCCATTTATG TTA	CGGAACAAGGGTTTCATAA TTC
<i>GLU</i>	AF239617	TACCTCTTTGCCATGTTTGA TG	AGTACTTCGGCTGTTTGT GG
<i>PAL</i>	X755967	TGCTGACTGGTGAAAAGGT G	CGTTCCAAGCACTGAGACA A
<i>STS</i>	XM_002262908	TTCAGCAGGAGCCATTGCC G	ACACATGCCTAGTTGCTTCC AA
<i>ACT</i>	AF369524	GCTGAGAGATTCCGTTGTCC	GCCACCACCTTGATCTTCAT

5.2.6. Análisis Estadístico

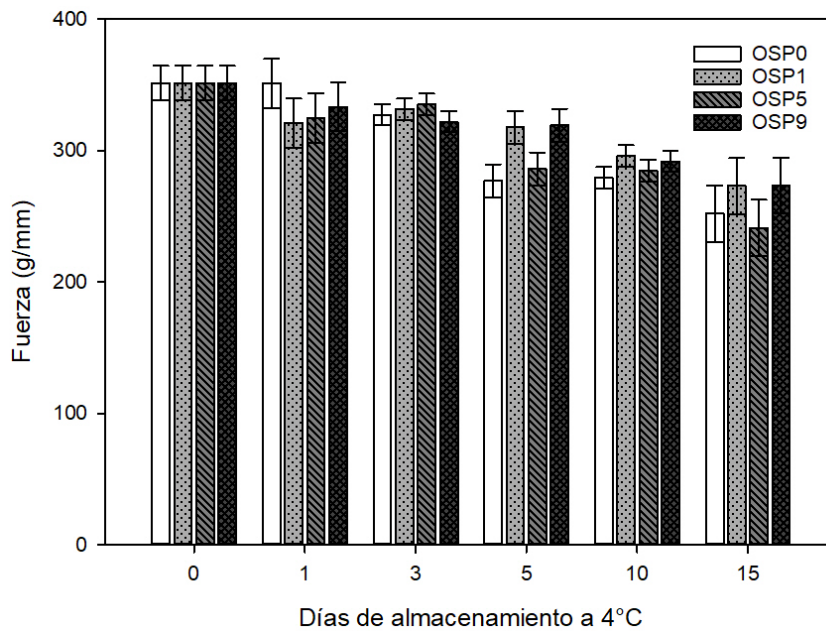
Los datos obtenidos se analizaron de acuerdo con un diseño aleatorio simple en cada día de muestreo mediante un análisis de varianza. Se reportaron medias de cuatro repeticiones con su desviación estándar. Se evaluaron diferencias significativas entre las medias a través de la prueba de Tukey-Kramer, con un nivel de significancia de 0.05.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Análisis de Calidad de Uvas Tratadas

6.1.1. Firmeza

A lo largo de 15 días de muestreo, se observó pérdida gradual de firmeza en todas las uvas almacenadas, sin embargo, no se observó diferencia significativa en los valores de firmeza reportados en ningún día con respecto al control o entre tratamientos ($p>0.05$; fig. 1).



1. Firmeza de uvas de mesa variedad Perlette durante almacenamiento a 4°C y 90% HR, tratadas con oligosacáridos de pectina de 3-20 GP en dosis de 1, 5 y 9 g/L. Letras distintas en cada día de almacenamiento indican diferencias significativas ($p<0.05$).

La firmeza de una fruta es un parámetro de calidad importante, ya que esta nos indica su estado de madurez y tiene influencia sobre la aceptabilidad de este ante consumidores. La pérdida de firmeza

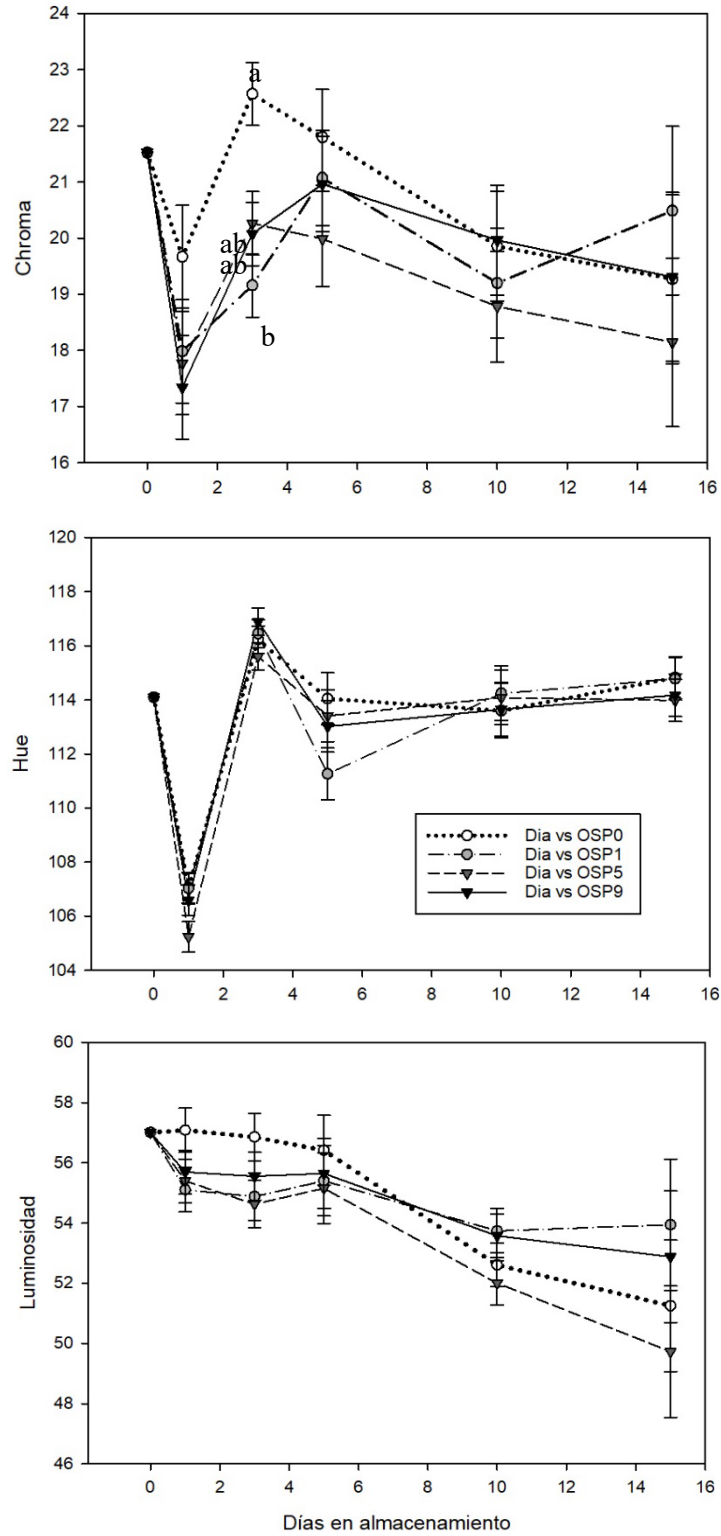
conlleva al descarte y desperdicio de fruta, así como susceptibilidad ante patógenos durante la poscosecha, y es causada por la acción de enzimas hidrolíticas que actúan sobre la pared celular, causando reducción en la turgencia celular, así como la pérdida de agua del fruto (Jackman y Stanley, 1995; Brummel y Harpster, 2001).

La reducción en la pérdida de firmeza en frutos de fresa se ha reportado por la aplicación de 5 y 9 g/L de OSP después de almacenamiento a 2°C y 90% HR por 14 días (Virgen-Ortiz *et al.*, 2020), en contraste con los resultados obtenidos en uva. Lu y colaboradores (2021) observaron que, al tratar frutos de tomate con una solución al 4% de OSP, retardaron por seis días la pérdida de firmeza durante almacenamiento a 25°C y 90-95% HR, lo que indica que la inhibición de enzimas degradativas de pared celular, como *SIPG2* contribuyen a este fenómeno. Al-Qurashi y Awad, en 2015, observaron que la aplicación de quitosano en uvas cv. “El-Bayadi” contribuyó a disminuir la pérdida de firmeza después de 30 días de almacenamiento en frío y en almacenamiento a 20°C, atribuyendo este efecto a la formación de una barrera semipermeable.

6.1.2. Color

Ninguno de los parámetros de color fueron afectados por la aplicación de oligosacáridos de pectina con respecto a las uvas control ($p > 0.05$). En uvas, cuando se habla de color, principalmente es referido al contenido de antocianinas que estas tienen, ya que la concentración de estos pigmentos influenciará el color rojo de las bayas. Sin embargo, en variedades blancas de uvas no hay presencia de estos compuestos, debido a mutaciones en genes relacionados con su síntesis, lo cual impide la coloración roja en estas uvas (Ferreira, 2019), haciendo que los principales compuestos relacionados con el color sean clorofilas y carotenoides, que proporcionan un cambio de verde a amarillo dependiendo del estado de madurez de la baya (Rocchi *et al.*, 2016).

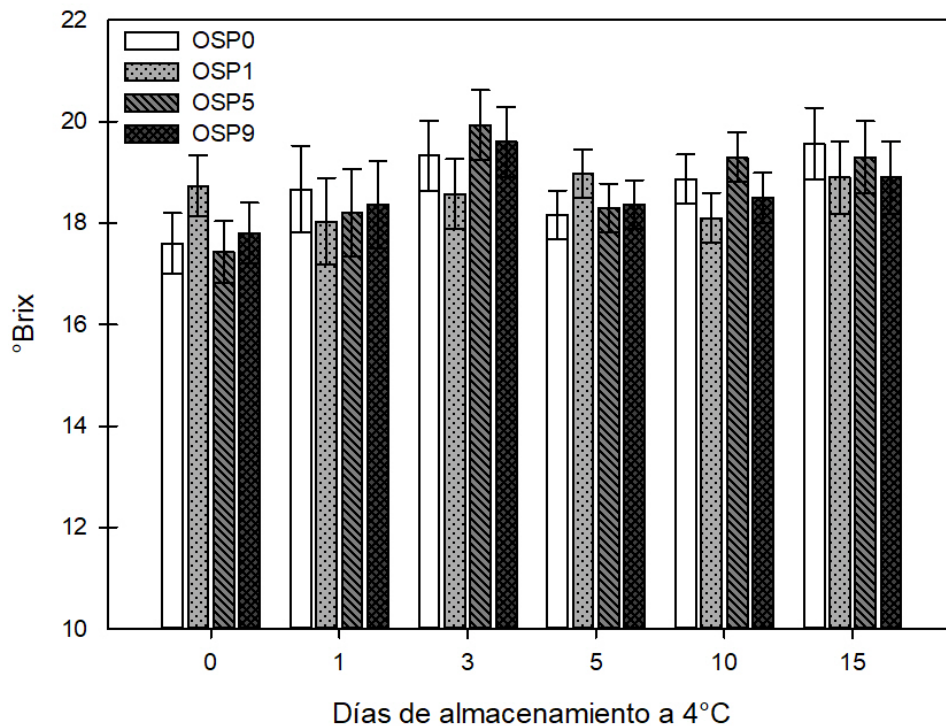
La aplicación de oligosacáridos de pectina ha resultado en la mejora de parámetros de color en variedades rojas de uva, debido a la inducción de genes relacionados con la síntesis de antocianinas (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2011; Sandoval-Silva *et al.*, 2021), por lo que, en variedad Perlette, no se esperan cambios en el tono ni matiz asociados a la activación de mecanismos biosintéticos relacionados con la vía de los fenilpropanoides.



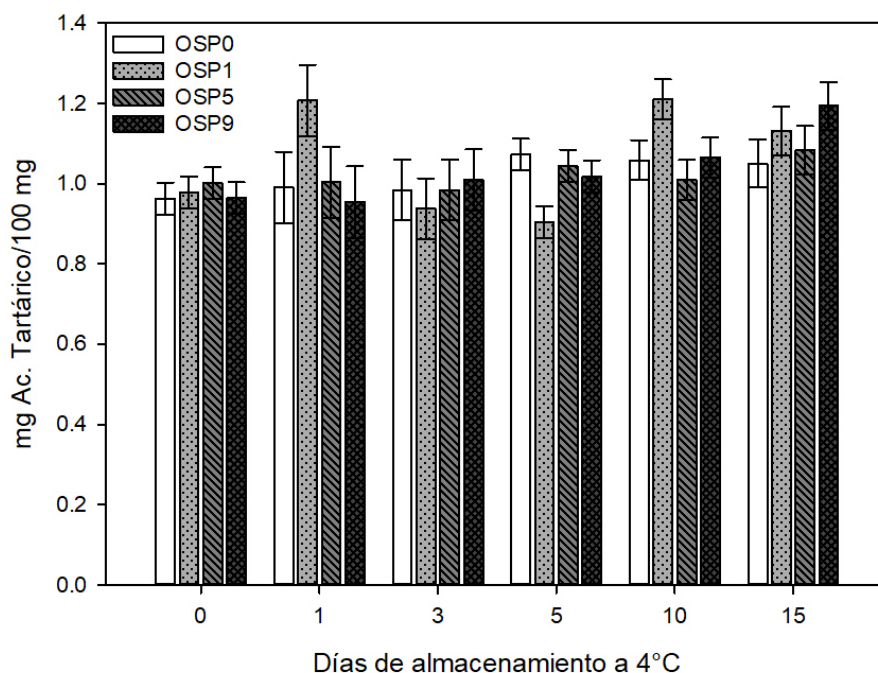
2. Cambios en el color de uva de mesa variedad Perlette durante el almacenamiento a 4°C y90% HR por la aplicación de OSP de 3-20 GP en concentraciones de 0, 1, 5 y 9 g/L sobre los parámetros Croma, Hue y Luminosidad. Letras distintas en cada punto de muestreo indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

6.1.3. Sólidos Solubles Totales y Acidez Titulable

Ninguna de las concentraciones de oligosacáridos de pectina utilizadas en el experimento alteraron significativamente la concentración de sólidos solubles totales ni la acidez titulable de las uvas durante el almacenamiento en frío ($p>0.05$). Las uvas de mesa, al ser un fruto no climatérico, no sufren cambios significativos en estos parámetros, especialmente en condiciones de almacenamiento.



3. Efecto de la aplicación de oligosacáridos de pectina de 3-20 GP en dosis de 0, 1, 5 y 9 g/L. sobre el contenido de sólidos solubles totales en uvas cv. Perlette almacenadas a 4°C y 90% HR. Letras distintas en cada punto en el tiempo indican diferencia significativa ($p<0.05$).



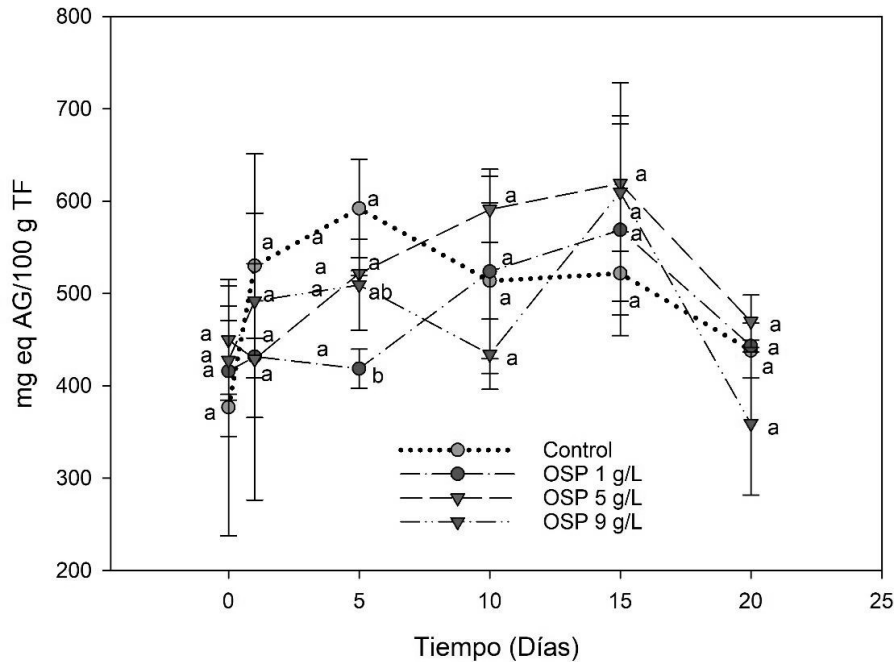
4. Efecto de la aplicación de oligosacáridos de pectina de 3-20 GP en dosis de 0, 1, 5 y 9 g/L sobre la acidez titulable en uvas cv. Perlette almacenadas a 4°C y 90% HR. Letras distintas en cada día de almacenamiento indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En uvas variedad Cabernet Sauvignon y Syrah, la aplicación precosecha de oligosacáridos de pectina (1.5 g/L) no alteró ninguno de estos parámetros (Villegas *et al.*, 2016; Sandoval-Silva *et al.*, 2021).

6.2. Fenoles Totales

La aplicación de OSP de 3-20 GP no afectó significativamente ($p > 0.05$) el contenido de fenoles totales en las bayas tratadas con oligosacáridos de pectina, permaneciendo los valores entre 475 y 600 meq de AG de las bayas tratadas y del control durante el almacenamiento, como se puede apreciar en la figura 5. Este resultado difiere al incremento en la expresión de *PAL* por efecto de los OSP (figura 6) que desencadena el metabolismo de los fenilpropanoides presentada del día 5 al 15 de almacenamiento que se discutirá posteriormente. Molina-Quijada y colaboradores (2010) reportan que, en uvas variedad Perlette, el compuesto fenólico mayoritario es el ácido gálico,

seguido por resveratrol y rutina. En eventos de invasión de un patógeno, la síntesis de estilbenos como el resveratrol es importante para combatir dicho ataque, y su síntesis ocurre gracias a la actividad de PAL y estilbeno sintasa (STS) (Błaszczyk *et al.*, 2019). Ya que la concentración de ácido gálico es mucho mayor a la de resveratrol, un posible aumento de este último pudiera no influenciar significativamente el contenido total de compuestos fenólicos en uvas estimuladas.



5. Efecto de la aplicación de oligosacáridos de pectina de 3-20 GP en dosis de 0, 1, 5 y 9 g/L sobre el contenido de fenoles totales en uva de mesa cv. Perlette almacenadas a 4°C y 90% HR. Literales diferentes en cada día de muestreo indican diferencia significativa ($p < 0.05$); n.s: no significativo ($p > 0.05$).

6.3. Resistencia Contra *Botrytis cinerea*

6.3.1. Expresión genética

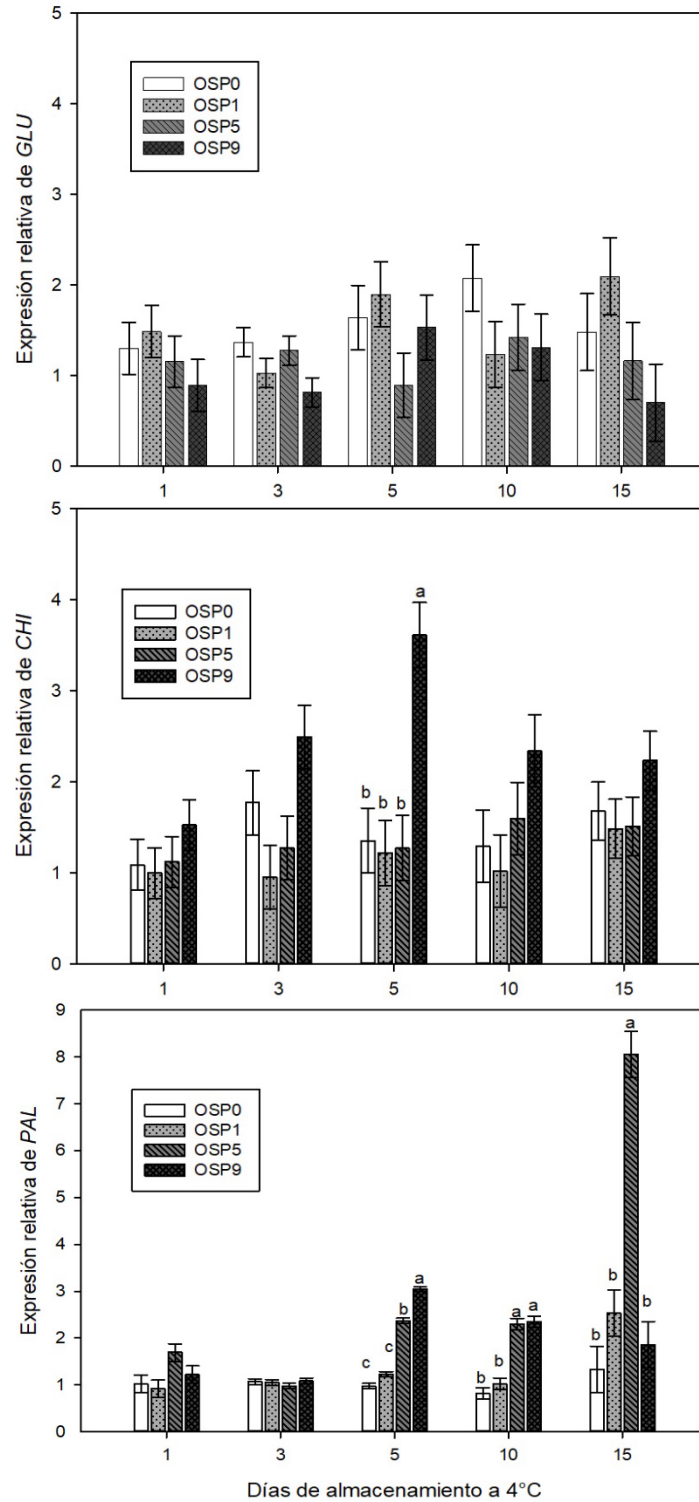
El análisis de expresión de genes relacionados a la patogénesis demostró que existen incrementos significativos en la expresión de *CHI* y *PAL* por la aplicación de OSP en la piel de las bayas del

cultivar Perlette durante el almacenamiento a 4°C y 90% HR (figura 6). La expresión de *CHI* incrementó significativamente 2.5 veces en el día 5 en las uvas tratadas con 9 g/L, regresando a niveles similares a los de las uvas tratadas con 0, 1 y 5 g/L a los 10 y 15 días de almacenamiento. Los tratamientos de 1 y 5 g/L de OSP presentaron niveles de expresión estadísticamente iguales al control. La expresión de *PAL* de las bayas tratadas con 5 y 9 g/L incrementó significativamente con respecto al control en los días 5 y 10 de almacenamiento refrigerado. A los 15 días de almacenamiento, la expresión de *PAL* en las bayas tratadas con 5 g/L presentaron una expresión 3 veces superior al resto de los tratamientos y el control.

La expresión de genes de resistencia contra el ataque de agentes patógenos o condiciones adversas es una parte fundamental para la defensa del tejido vegetal contra estos. Un aumento en la expresión de estos genes puede deberse a condiciones ambientales no favorables, patrones moleculares asociados a patógenos, o patrones originados por el ataque de los mismos.

Se ha demostrado en estudios anteriores que la aplicación de OSP en diversos tejidos vegetales inducen un aumento en la expresión de *PAL*, *CHI* y *GLU*. Aziz y colab. (2004) observaron en células de hoja de vid un aumento en la expresión de varios genes de resistencia, incluyendo *PAL*, *CHI* y *GLU*, tras la aplicación de 0.5 g/L de OSP y después de distintos intervalos de tiempo.

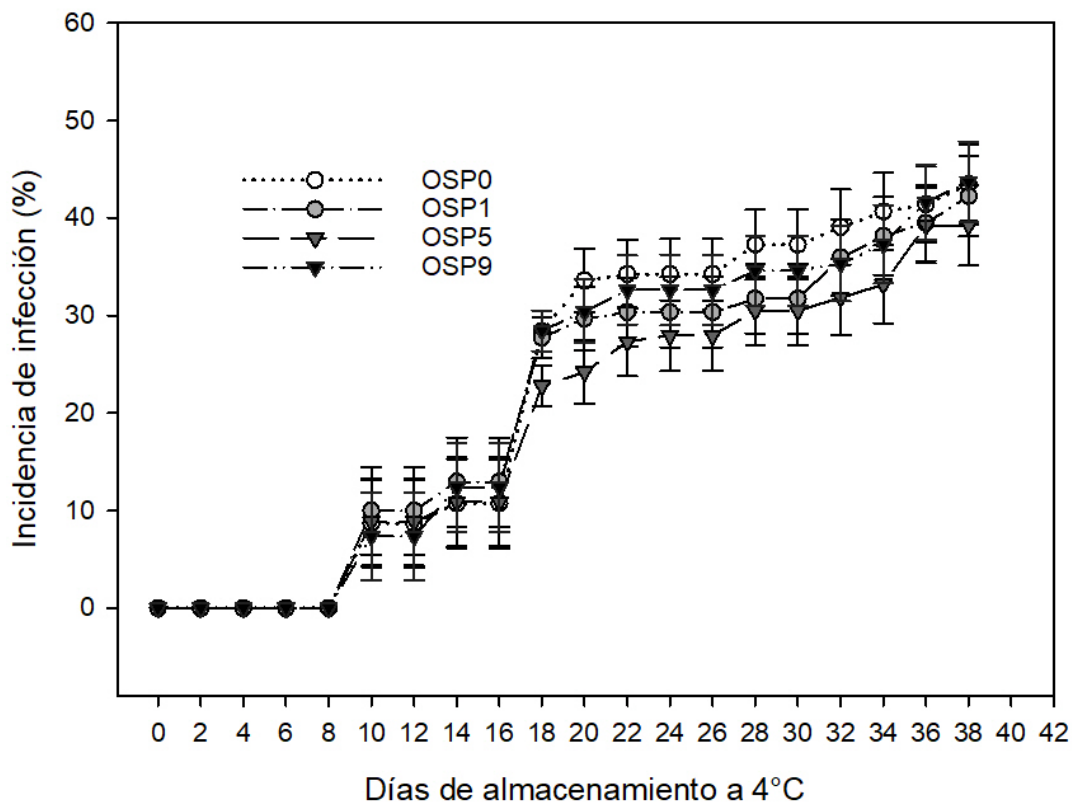
También se ha demostrado que la aplicación de OSP en uvas pre-envero aumentan la expresión de *PAL* induciendo la síntesis de antocianinas y la mejora del color en uvas rojas (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2010; Villegas *et al.*, 2016) Sin embargo, en este estudio, la expresión de *PAL* fue tardía para activar el mecanismo de defensa contra fitopatógenos. En toronja tratada con OSP se observó un aumento en la expresión de genes relacionados con actividad antioxidante después de 42 días de almacenamiento a 2°C (Vera-Guzmán *et al.*, 2019).



6. Efecto de la aplicación de oligosacáridos de pectina de 3-20 GP en dosis de 0, 1, 5 y 9 g/L en la expresión de genes relacionados con resistencia a *B. cinerea* en uva de mesa cv. Perlette durante almacenamiento de 15 días a 4°C y 90% HR. Letras distintas en cada día de almacenamiento indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.3.2. Incidencia de Infección

En las condiciones de almacenamiento de este trabajo, la aplicación de OSP de 3-20 GP en dosis de 1, 5 y 9 g/L no redujeron la infección de *B. cinerea* en las bayas tratadas con respecto al control ($p>0.05$; fig. 8). En todos los tratamientos y el control se observó clorosis severa con crecimiento micelial en la zona de punción. Este efecto puede estar relacionado a los niveles de expresión de los mecanismos de defensa de *GLU* y *CHI*, insuficientes para activar el mecanismo enzimático para contrarrestar el crecimiento micelial del fitopatógeno (fig. 7). En algunos casos se observó rompimiento de la baya y crecimiento micelial alrededor de la baya sin hacer diferencia entre tratamientos.



7. Efecto de la aplicación de oligosacáridos de pectina de 3-20 GP en dosis de 0, 1, 5 y 9 g/L en la incidencia de infección de *B. cinerea* en uva de mesa cv. Perlette durante almacenamiento a 4°C y 90% HR. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p>0.05$).

Previamente se ha observado que la aplicación de OSP por sí mismos o en combinación con otro químico permite que distintos frutos y tejidos retarden su deterioro natural o resistan el ataque de microorganismos patógenos. En hojas de vid cultivadas *in vitro* se observó una reducción de hasta el 65% del diámetro de infección de *Botrytis cinerea* (Aziz *et al.*, 2004). En uva se observó una reducción de hasta 38% de incidencia de infección y hasta 82% en severidad tras la aplicación preventiva de una mezcla de OSP y oligosacáridos de quitosano (concentración final de 12.5 g/L; aplicaciones de 3 l/ha) y un concentrado líquido soluble durante el desarrollo de frutos (van Aubel *et al.*, 2014). Asimismo, se observó reducción de 3.3 y 6.7 veces en el índice de deterioro natural en fresas tratadas con 5 y 9 g/L de OSP (Virgen-Ortiz *et al.*, 2019).

Se ha demostrado que la expresión de genes de resistencia inducida por la presencia de microorganismos fitopatógenos no es suficiente para prevenir o mitigar el daño que estos causan en el fruto, en algunos casos incluso siendo ineficaces debido a que el fitopatógeno logra contrarrestar estas medidas de resistencia. Este fenómeno se observó en uvas infectadas por *Erysiphe necator* en distintos estados de madurez, donde la expresión y actividad de mecanismos de resistencia contra el patógeno resultó insuficiente para prevenir el avance la infección (Pimentel *et al.*, 2021).

En el caso de *Botrytis cinerea*, se ha demostrado que algunas cepas agresivas logran mitigar la acumulación de resveratrol en tejidos vegetales, convirtiéndolo mediante procesos oxidativos en dímeros, y por tanto la inducción de esta fitoalexina resulta inefectiva contra el patógeno (Cichewikz *et al.*, 1999). Asimismo, se ha observado que *B. cinerea* promueve el deterioro de tejidos vegetales mediante la síntesis y liberación de especies reactivas de oxígeno, o mediante la promoción de muerte celular programada debido a la inducción de la respuesta hipersensible (Govrin y Levine, 2000; Govrin *et al.*, 2005; Hua *et al.*, 2018).

El objetivo de este trabajo de investigación fue determinar si el uso de oligosacáridos de pectina en uvas de mesa puede inducir un aumento en la expresión de genes relacionados con resistencia a fitopatógenos, y si este efecto las hace más resistentes al ataque de *Botrytis cinerea*, sin alterar las características de calidad de las bayas. Cabe resaltar que este es el primer estudio en abordar el uso de este elicitor durante el almacenamiento poscosecha de uva de mesa. A pesar se logró inducir la expresión de genes relacionados con resistencia (*CHI* y *PAL*) sin alterar negativamente las características de calidad de las uvas tratadas, no se observó mayor resistencia contra el ataque del hongo en cuestión

7. CONCLUSIONES

Considerando lo discutido anteriormente, se puede concluir que la mezcla de OSP de 3-20 GP inducen el incremento de la expresión de *CHI* y *PAL* en aplicación poscosecha en dosis de 5 o 9 g/L, las cuales no inducen un incremento de expresión suficiente para activar los mecanismos de resistencia contra patógenos de las uvas de mesa cv. Perlette.

8. RECOMENDACIONES

Es posible que concentraciones más altas de OSP logren promover mayor resistencia contra el patógeno, lo cual se ha observado en tomate tras la aplicación de una solución de OSP 4% (p/v) y almacenamiento por 48h a 25°C, logrando una reducción de hasta 44.4% con respecto al control, y un aumento en la expresión de *SIPAL* y *SIPRI* el cual codifica para la proteína de resistencia PR1 (Lu *et al.*, 2021).

Se recomienda expandir este proyecto con concentraciones más altas de oligosacáridos de pectina; una concentración viable sería 40 g/L según la bibliografía consultada, así como el análisis de más genes relacionados, entre ellos *STS*, el cual se validó durante este proyecto. Asimismo, se recomienda analizar el uso de oligosacáridos de pectina en combinación con otro elicitor.

También se recomienda analizar la actividad de enzimas relacionadas con resistencia al ataque de patógenos, con el fin de hacer una correlación con los niveles expresión relativa observados del gen en cuestión.

9. REFERENCIAS

- FAO. (2019). FAOSTAT. Obtenido de: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
- SIAP. (2019). Avance de Siembras y Cosechas – Fichas por estado. Obtenido de: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do
- OIV (2016). Estadísticas de producción, exportación, importación, y consumo de uvas frescas, uvas de mesa, uvas secas y vino. Obtenido de <https://www.oiv.int/en/statistiques/?year=2016&countryCode=MEX>
- FAO. (2019). El Estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación – Progreso de la Lucha contra el Desperdicio de Alimentos. Obtenido de: <http://www.fao.org/3/ca6030es/ca6030es.pdf>
- PROFECO. (1996). NMX-FF-026-1994. Productos alimenticios no industrializados para uso humano fruta fresca. Uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) Especificaciones. Obtenido de: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-026-1994.PDF>
- USDA. (1999). United States Standards for Grades of Table Grapes (European or Vinifera Type). Obtenido de: <https://www.ams.usda.gov/grades-standards/table-grapeseuropean-or-vinifera-type-grades-and-standards>
- Codex Alimentarius. (2007). Standard for table grapes (CODEX STAN 255-2007). Obtenido de: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcode%252FStandards%252FCXS%2B255-2007%252FCXS_255e.pdf
- Poni, S., Gatti, M., Palliotti, A., Dai, Z., Duchêne, E., Truong, T. T., Ferrara, G., Matarrese, M. S., Gallotta, A., Bellincontro, A., Mencarelli, F., y Tombesi, S. (2018). Grapevine quality: A multiple choice issue. *Scientia Horticulturae*, 234: 445–462.
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., y Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13. (4): 414–430.
- Dewey, F. M., Grant-Downton R. (2016) *Botrytis*-Biology, Detection and Quantification. En: Fillinger S., Elad, Y. (eds) *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer, Cham, 17 – 34 pp.
- Holz, G., Coertze, S., Williamson B. (2007) The Ecology of *Botrytis* on Plant Surfaces. En: Elad, Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (eds) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer, Dordrecht, 9 – 27 pp
- Jaspers MV, Seyb AM, Trought MCT, Balasubramaniam R (2013) Overwintering grapevine debris as an important source of *Botrytis cinerea* inoculum. *Plant Pathology* 62:130–138
- Carisse, O. (2016) Epidemiology and Aerobiology of *Botrytis* spp. En: Fillinger, S., Elad, Y. (eds) *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer, Cham, 127 – 148 pp
- Nakajima, M., Akutsu, K. (2014). Virulence factors of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant*

- Pathology, 80(1), 15–23.
- van Kan, J. A. L. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, 11(5), 247–253.
- Nafisi, M., Stranne, M., Zhang, L., Van Kan, J. A. L., Sakuragi, Y. (2014). The endo- arabinanase BcAra1 is a novel host-specific virulence factor of the necrotic fungal phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(8), 781–792.
- Govrin, E. M., Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10. (13): 751–757.
- Cui, H., Tsuda, K., & Parker, J. E. (2015). Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annual Review of Plant Biology*, 66. (1): 487–511.
- Zhang, Z., Wu, Y., Gao, M., Zhang, J., Kong, Q., Liu, Y., Ba, H., Zhou, J., Zhang, Y. (2012). Disruption of PAMP-induced MAP kinase cascade by a pseudomonas syringae effector activates plant immunity mediated by the NB-LRR protein SUMM2. *Cell Host and Microbe*, 11. (3): 253–263.
- Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A.,Reissmann, S., Kahmann, R. (2015). Fungal Effectors and Plant Susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, 66. (1): 513–545
- Denancé, N., Sánchez-Vallet, A., Goffner, D., Molina, A. (2013). Disease resistance or growth: The role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in Plant Science*, 4:155.
- Shine, M. B., Yang, J. W., El-Habbak, M., Nagyabhyru, P., Fu, D. Q., Navarre, D., Ghabrial, S., Kachroo, P., Kachroo, A. (2016). Cooperative functioning between phenylalanine ammonia lyase and isochorismate synthase activities contributes to salicylic acid biosynthesis in soybean. *New Phytologist*, 212. (3): 627–636.
- Sudisha, J., Sharathchandra, R.G., Amruthesh, K.N., Kumar, A., Shetty H.S. (2012) Pathogenesis Related Proteins in Plant Defense Response. En: Mérillon, J., Ramawat, K.(eds.). *Plant Defence: Biological Control*. Springer, Dordrecht, pp. 379 - 403
- Elad, Y. (2016) Cultural and Integrated Control of *Botrytis* spp. En: Fillinger, S., Elad, Y. (eds.) *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer, Cham, 149 – 164 pp.
- Singh, N.S., Sharma R., Parween, T., Patanjali, P.K. (2018) Pesticide Contamination and Human Health Risk Factor. En: Oves, M., Khan M. Z., Ismail, I. M. I. (eds.). *Modern Age Environmental Problems and their Remediation*. Springer, Cham, 49 – 68 pp.
- Dhananjayan, V., Jayakumar, S., Ravichandran, B. (2020) Conventional Methods of Pesticide Application in Agricultural Field and Fate of the Pesticides in the Environment and Human Health. En: Rakhimol K. R., Sabu Thomas, Tatiana Volova, Jayachandran K. (eds.). *Controlled Release of Pesticides for Sustainable Agriculture*. Springer, Cham, 1 – 39 pp.
- USDA. (2011). Sulfur Dioxide. Recuperado desde:
<https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Sulfur%20dioxide%20smoke%20bomb%20report%202011.pdf>

- Jacometti, M. A., Wratten, S. D., & Walter, M. (2010). Review: Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 16. (1): 154–172.
- Hahn, M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* a case study. *Journal of Chemical Biology*. 7. (4): 133–141.
- Giraud, E., Ivanova, A., Gordon, C. S., Whelan, J., & Considine, M. J. (2012). Sulphur dioxide evokes a large scale reprogramming of the grape berry transcriptome associated with oxidative signalling and biotic defence responses. *Plant, Cell and Environment*. 35. (2): 405–417.
- Considine, M. J., Foyer, C. H. (2015). Metabolic responses to sulfur dioxide in grapevine (*Vitis vinifera* L.): Photosynthetic tissues and berries. *Frontiers in Plant Science*, 6:60.
- Duarte-Sierra, A., Aispuro-Hernández, E., Vargas-Arispuro, I., Islas-Osuna, M. A., González-Aguilar, G. A., Martínez-Téllez, M. Á. (2016). Quality and PR gene expression of table grapes treated with ozone and sulfur dioxide to control fungal decay. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96. (6): 2018–2024.
- Xue, M., Yi, H. (2017). Induction of disease resistance providing new insight into sulfur dioxide preservation in *Vitis vinifera* L. *Scientia Horticulturae*. 225. 567–573.
- Romanazzi, G., Smilanick, J. L., Feliziani, E., Droby, S. (2016). Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*. 113. 69–76.
- Bolívar-Anillo, H. J., Garrido, C., Collado, I. G. (2019). Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry Reviews*.
- Jia, H., Zhang, C., Pervaiz, T., Zhao, P., Liu, Z., Wang, B., Wang, C., Zhang, L., Fang, J., Qian, J. (2016). Jasmonic acid involves in grape fruit ripening and resistant against *Botrytis cinerea*. *Functional and Integrative Genomics*. 16. (1): 79–94.
- van Aubel, G., Buonatesta, R., & Van Cutsem, P. (2014). COS-OGA: A novel oligosaccharidic elicitor that protects grapes and cucumbers against powdery mildew. *Crop Protection*. 65. 129–137.
- Davidsson, P., Broberg, M., Kariola, T., Sipari, N., Pirhonen, M., Palva, E. T. (2017). Short oligogalacturonides induce pathogen resistance-associated gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*. 17. (19): 1–17.
- Patova, O. A., Golovchenko, V. V., Ovodov, Y. S. (2014). Pectic polysaccharides: Structure and properties. *Russian Chemical Bulletin* 63. (9): 1901–1924.
- Choi, H. W., Klessig, D. F. (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biology*. 16. (232): 1–10.
- Kohorn, B. D., Kohorn, S. L. (2012). The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors. *Frontiers in Plant Science*, 3:88.
- Vidhyasekaran, P. 2014. *PAMP Signals in Plant Innate Immunity*. Springer, Dordrecht. 442pp.
- Vidhyasekaran P. 2015. *Plant Innate Immunity. Signaling and Communication in Plants*. Springer, Dordrecht. 458 pp.
- Ali, S., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Bhat, A. A., Mir, Z. A., Bhat, J. A., Tyagi, A., Islam, S.T.,

- Mushtaq, M., Yadav, P., Rawat, S., Grover, A. (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*. 212–213. 29–37.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3. (1): 2–20.
- Živković, S., Stevanović, M., Đurović, S., Ristić, D., Stošić, S. (2018). Antifungal activity of chitosan against *Alternaria alternata* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Pestic. Phytomed.* 33. (3-4): 197 – 204)
- Li, F., L, F., Yang, Y., Yin, R., Ming, J. (2019). Comparison of phenolic profiles and antioxidant activities in skins and pulps of eleven grape cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Integrative Agriculture*. 18(5): 1148 – 1158.
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., Joubert, J. M., & Pugin, (2003). Laminarin Elicits Defense Responses in Grapevine and Induces Protection Against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(12), 1118–1128.
- Aziz, A., Heyraud, A., & Lambert, B. (2004). Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta*, 218(5), 767–774.
- Virgen-Ortiz, J. J., Morales-Ventura, J. M., Colín-Chávez, C. C., Esquivel-Chávez, F., Vargas-Arispuro, I., Aispuro-Hernández, E., Martínez-Téllez, M. A. (2019). Postharvest application of pecticoligosaccharides on quality attributes, activities of defense-related enzymes, and anthocyanin accumulation in strawberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 100(5): 1949 – 1961.
- Xu, T., Huang, K., Guo, F., Qu, W., Yang, J., Liang, Z., Luo, Y. (2007). Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 46. 86 – 94.
- Campa-Siqueiros, P., Vallejo-Cohen, S., Corrales-Maldonado, C., Martínez-Téllez, M. Á., Vargas-Arispuro, I., & Ávila-Quezada, G. (2017). Reducción en la incidencia de la pudrición gris en uva de mesa por el efecto de volátiles de un extracto de ajo. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(3), 494–508.
- Jackman, R. L., & Stanley, D. W. (1995). Perspectives in the textural evaluation of plant foods. *Trends in Food Science and Technology*, 6(6), 187–194.
- Brummell, D. A., & Harpster, M. H. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 47(1–2), 311–339.
- Al-Qurashi, A. D., & Awad, M. A. (2015). Postharvest chitosan treatment affects quality, antioxidant capacity, antioxidant compounds and enzymes activities of “El-Bayadi” table grapes after storage. *Scientia Horticulturae*, 197, 392–398.
- Lu, L., Yang, Y., Zhang, H., Sun, D., Li, Z., Guo, Q., Wang, C., & Qiao, L. (2021). Oligogalacturonide-accelerated healing of mechanical wounding in tomato fruit requires calcium-dependent systemic acquired resistance. *Food Chemistry*, 337(August 2020), 127992.
- Ferreira, V., Matus, J. T., Pinto-Carnide, O., Carrasco, D., Arroyo-García, R., & Castro, I. (2019).

- Genetic analysis of a white-to-red berry skin color reversion and its transcriptomic and metabolic consequences in grapevine (*Vitis vinifera* cv. 'Moscatel Galego'). *BMC Genomics*, 20(1), 1–17.
- Molina-Quijada, D. M. A., Medina-Juárez, L-A., González-Aguilar, G. A., Robles-Sánchez, R. M. & Gámez-Meza, N. (2010). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cáscara de uva (*Vitis vinifera* L.) de mesa cultivada en el noroeste de México Phenolic compounds and antioxidant activity of table grape (*Vitis vinifera* L.) skin from northwest Mexico. *CyTA Journal of Food*, 8(1), 57 – 63.
- Ochoa-Villarreal, M., Vargas-Arispuro, I., Islas-Osuna, M. A., González-Aguilar, G., Martínez-Téllez, M. A. (2010). Pectin-derived oligosaccharides increase color and anthocyanin content in Flame Seedless grapes. *J Sci Food Agric*, 91, 1928–1930.
- Villegas, D., Handford, M., Alcalde, J. A., Perez-Donoso, A. (2016). Exogenous application of pectin-derived oligosaccharides to grape berries modifies anthocyanin accumulation, composition and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry* 104 (2016) 125 – 133.
- Vera-Guzmán, A., Aispuro-Hernández, E., Vargas-Arispuro, I., Martínez-Téllez, M. A. (2019). Expression of antioxidant-related genes in flavedo of cold-stored grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad cv. Rio Red) treated with pectic oligosaccharides. *Scientia Horticulturae*, 243, 274 – 280.
- Pimentel, D., Amaro, R., Erban, A., Mauri, N., Soares, F., Rego, C., Martínez-Zapater, J. M., Mithöfer, A., Kopka, J., Fortes, A. M. (2021). Transcriptional, hormonal, and metabolic changes in susceptible grape berries under powdery mildew infection. *Journal of Experimental Botany*, Junio 2021, 1-26.
- Cichewicz, R. H., Kouzi, S. A., Hamann, M. T. (2000). Dimerization of Resveratrol by the Grapevine Pathogen *Botrytis cinerea*. *J. Nat. Prod.*, 63, 29-33.
- Govrin, E. M., Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10, 751 – 757.
- Govrin, E. M., Rachmilevitch, S., Tiwari, B., Solomon, M., Levine, A. (2006). An Elicitor from *Botrytis cinerea* Induces the Hypersensitive Response in *Arabidopsis thaliana* and Other Plants and Promotes the Gray Mold Disease. *Phytopathology*, 96(3), 299 – 307.
- Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., Shiping, T. (2018). Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 2018(3) 111–119.

10. ANEXOS

10.1. Análisis Preliminares de Calidad de Uvas de Mesa cv. Perlette Cosechadas en Junio 2019 tras la Aplicación de Distintas Concentraciones de OSP.

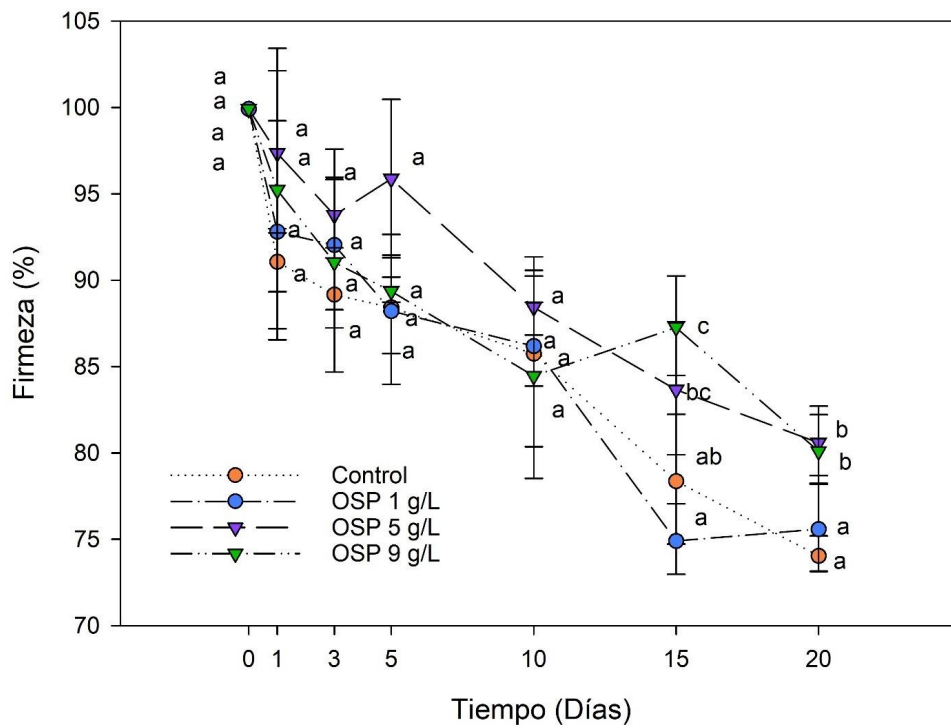


Fig. 8. Cambios en la firmeza de uvas de mesa cv. Perlette durante almacenamiento a 4°C y 90% HR, tratadas con oligosacáridos de pectina de 3-20 GP en dosis de 1, 5 y 9 g/L. Letras distintas en cada punto de muestreo indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

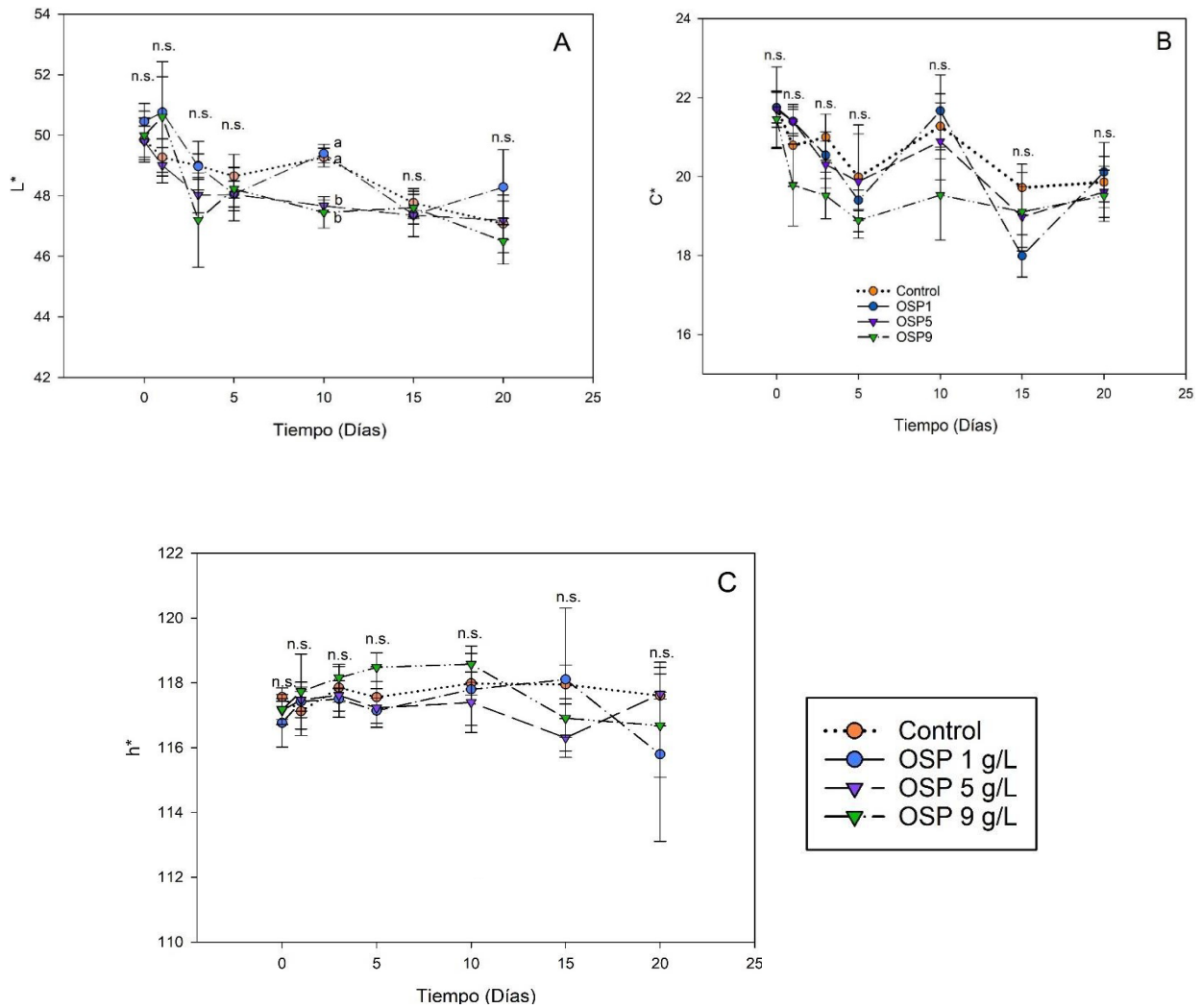


Fig. 9. Cambios en el color de uva de mesa variedad Perlette durante el almacenamiento a 4°C y 90% HR por la aplicación de oligosacáridos de pectina sobre los parámetros L* (A), C* (B) y h* (C). Letras distintas en cada punto de muestreo indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

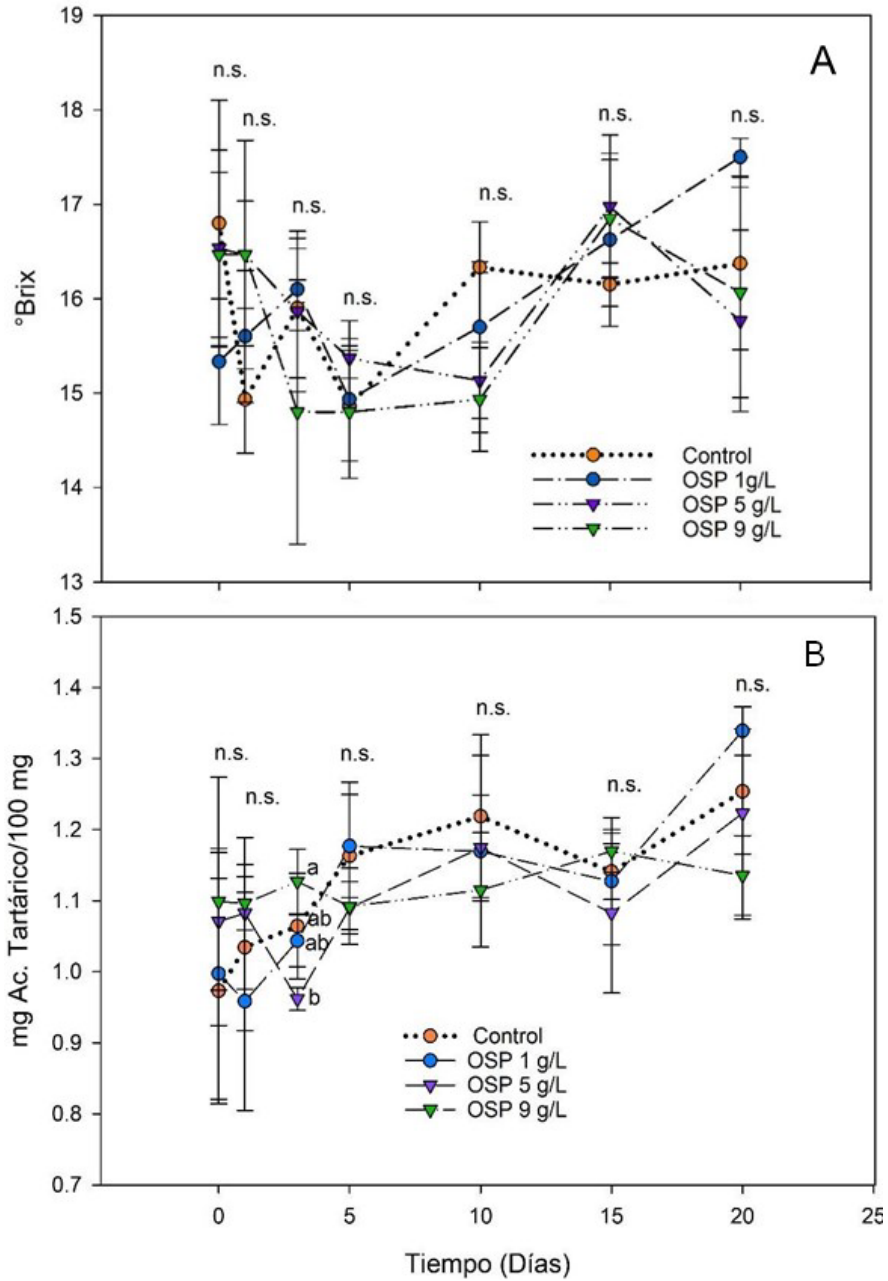


Fig. 10. Efecto de la aplicación de oligosacáridos de pectina sobre el contenido de sólidos solubles totales (A) y acidez titulable (B) en uvas cv. Perlette. Letras distintas en cada punto en el tiempo indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

10.2. Validación de *STS*

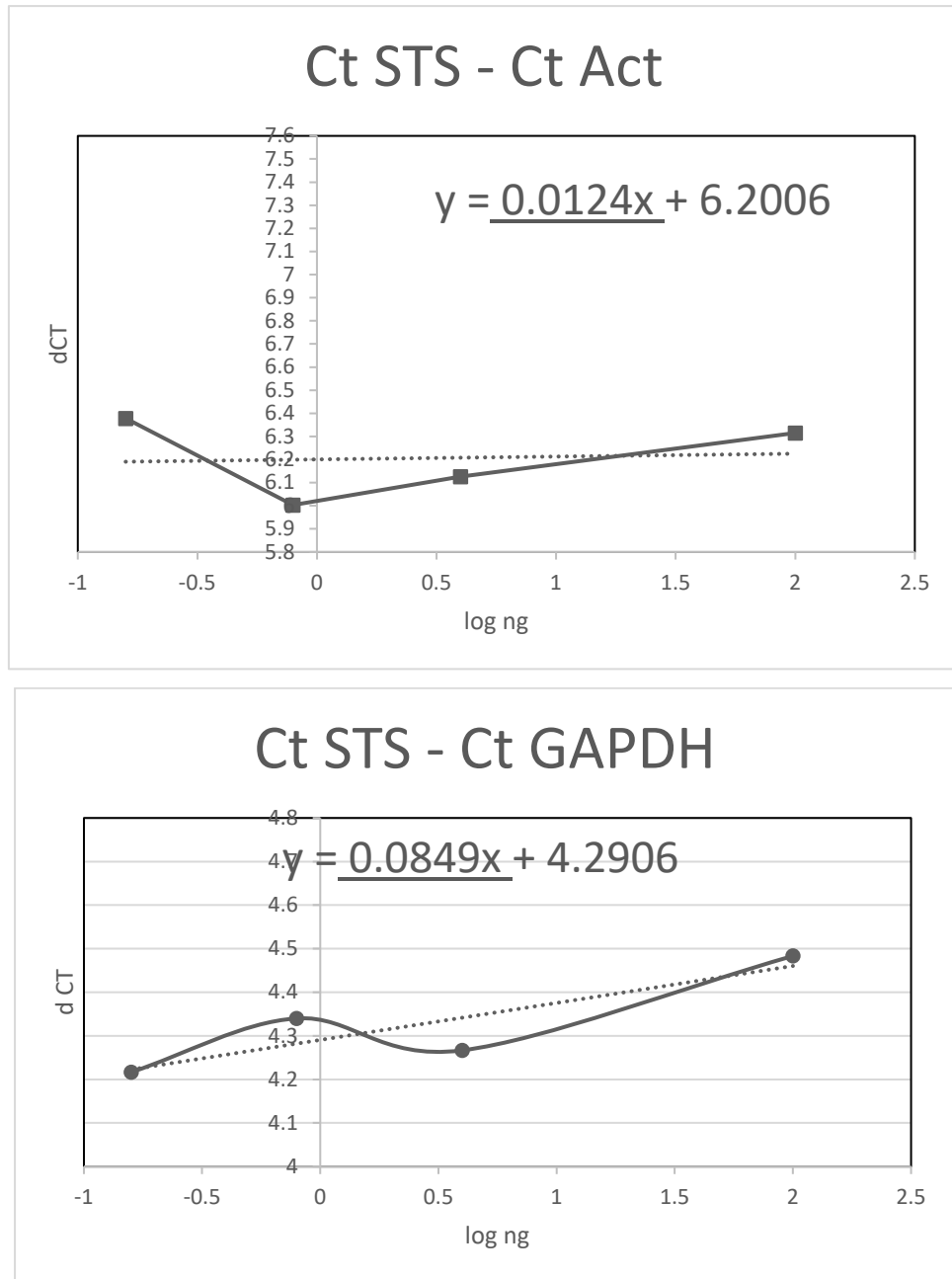


Fig. 11. Validación del gen estilbeno sintetasa (*STS*) con respecto al gen constitutivo actina (*ACT*) y *GAPDH*.