

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

ETIOLOGÍA DE LA PUDRICIÓN DE RACIMOS DE LA VID (*Vitis vinifera* L.)
PARA MESA EN VIÑEDOS DE HERMOSILLO, SONORA

Por

Francisco José Rivas-Santoyo

TESIS APROBADA POR LA
DIRECCIÓN DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

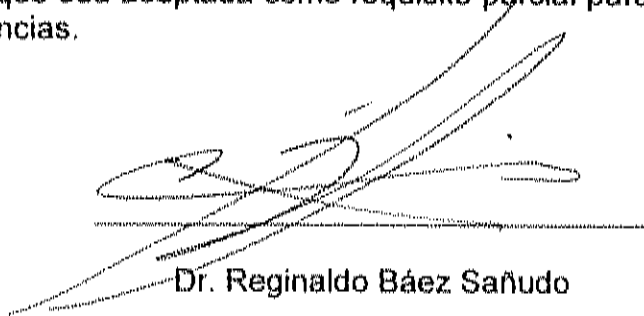
DOCTOR EN CIENCIAS

HEHMOSSILLO, SONORA MÉXICO

Diciembre de 2004

APROBACIÓN

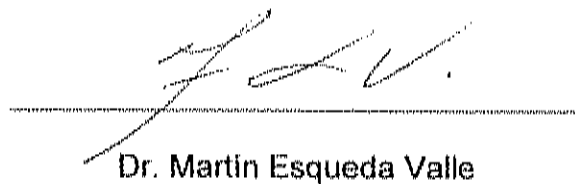
Los miembros del comité designado para revisar la tesis del Maestro en Ciencias Francisco José Rivas Santoyo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



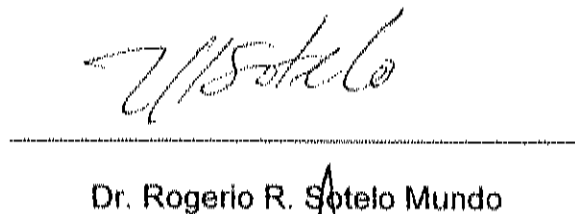
Dr. Reginaldo Báez Sañudo



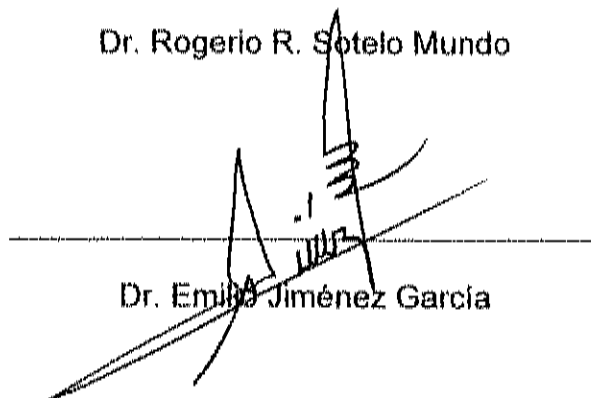
Dr. Alberto González León



Dr. Martín Esqueda Valle



Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo



Dr. Emilio Jiménez García

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (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 o directora de la tesis.

Dr. Alfonso A. Gardea Béjar

Director General

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, mi alma mater, por la oportunidad de superarme mediante su apoyo para realizar mis estudios de doctorado.

Al Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora por brindarme su apoyo y colaboración.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. por aceptarme en su programa de Doctor en Ciencias y proporcionarme la formación académica para lograr mi objetivo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Al Dr. Reginaldo Báez Sañudo por todas sus enseñanzas, consejos, apoyo y amistad.

A los integrantes de mi comité de tesis, Dr. Alberto González León, Dr. Martín Esqueda Valle, Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo y Dr. Emilio Jiménez García, por su asesoría, sugerencias y recomendaciones en la realización del trabajo de investigación.

A la Dra. María A. Islas Osuna por sus atinadas intervenciones, asesoría, apoyo y amistad en la realización de la presente investigación.

Al Dr. Rogerio Sotelo Mundo por su amistad, apoyo y orientación para el mejor desarrollo del trabajo de tesis y por sus enseñanzas a través de mi estancia en el CIAD.

A la Dra. María de Jesús Yáñez-Morales por brindarme su apoyo y colaboración en la caracterización molecular del hongo en estudio y por sus sugerencias en la revisión del escrito.

A la Dra. Elizabeth Cárdenas-Soriano por su amistad y apoyo incondicional al recibirme y orientarme durante mi estancia en el IFIT del Colegio de Postgraduados y por sus valiosas recomendaciones en la revisión del escrito.

Al Ing. Rodolfo Romo Valenzuela por su amistad, apoyo y colaboración en las evaluaciones de campo.

A la Q.B. Elsa Bringas Taddei por su permanente disposición, amable y eficiente, en la realización del trabajo de investigación.

Al M.C. Jesús Manuel García Robles por su apoyo, colaboración y amistad para lograr mis estudios y el trabajo de investigación.

Al M.C. Edgar Felipe Morán Palacio por su colaboración y apoyo técnico en la realización de la investigación.

A la M.C. Nidia Caceres Carrizosa por su colaboración, apoyo técnico y amistad.

A todos y cada uno de los integrantes del personal de apoyo y asistentes de investigación del Departamento de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal por su disposición, colaboración y amistad.

A mis amigos, Manuel, Edgar, Edmundo, Jorge, Ramón Ignacio, Mildred, Eugenia, Marie y Eréndira por su amistad y apoyo en todo momento.

A mis compañeras y amigas Amparo, Deysi y Graciela por darme su amistad y permitirme la oportunidad de compartir y convivir tan gratos momentos durante mi estancia en el CIAD, reconociendo su apoyo, participación crítica y aportaciones hacia el trabajo de investigación.

Al personal de docencia y biblioteca del CIAD: Ana Isabel, Verónica, Héctor, Gerardo, Luis, Fernando y Magdalena por todas sus atenciones y eficiente participación en apoyo de nuestra formación.

A todos los investigadores y académicos del CIAD por propiciar y motivar el análisis crítico de la investigación; por compartir sus conocimientos y experiencias en aras de la superación académica de sus estudiantes.

DEDICATORIA

A mi esposa Amparo
Con amor, mi motivo de inspiración

A mis hijas Lillán Alicia, Ana Laura, Alma Lucia y Adriana Leticia
Con amor, siempre lo mejor de mí para ustedes

A la Memoria de mis Padres:
Prof. Pedro A. Rivas Bonillas y Profa. Balvanera Santoyo Leal
Con amor y admiración

A Mis Hermanos y Hermanas:
Pedro Alfonso, Ramón Fernando, Alejandro Ernesto,
María Dolores, Magdalena, Joaquina Elena y Balvanera Luz
Con amor

A la Memoria de:
Tomás A. Castro Castro
Con cariño y respeto

A la Memoria de:
Biol. Pedro Ávila Salazar
Con respeto, admiración y agradecimiento eterno

A quienes debo mi formación y superación:
Mis Maestros y Amigos
Ing. Jesús M. Ávila Salazar y Dr. Emilio Jiménez García
Con respeto, admiración y agradecimiento

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xii
CAPÍTULOS	
I. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES	1
Cultivo de la vid en el mundo	2
Producción de la vid para mesa	2
Pudrición de racimos de la vid	4
Características morfológicas de la vid	8
<i>Botrytis cinerea</i> Pers., agente causal de la pudrición de racimos de la vid	11
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	15
II. ETIOLOGÍA DE LA PUDRICIÓN DE RACIMOS EN UVA PARA MESA EN VIÑEDOS DE HERMOSILLO	16
RESUMEN	17
ANTECEDENTES	18
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Muestreo	21
Aislamiento	22
Caracterización morfológica	23
Caracterización molecular	23
Inoculaciones artificiales <i>in vivo</i>	24
Histopatología	25
RESULTADOS Y DISCUSION	27
Muestreo	27
Aislamiento	27
Caracterización morfológica	27
Caracterización molecular	29
Inoculaciones artificiales <i>in vivo</i>	29
Histopatología	29
III. ACTIVIDAD DE QUITINASAS ASOCIADAS A UNA INFECCIÓN ARTIFICIAL CON <i>BOTRYTIS</i> Y DETECCIÓN MOLECULAR DE UN GEN ESPECÍFICO DEL HONGO	37
RESUMEN	38

ANTECEDENTES	39
MATERIALES Y MÉTODOS	44
Análisis de quitinasas	44
Caracterización molecular de <i>B. cinerea</i> en las bayas	44
Extracción del ADN del hongo y de las bayas	45
Amplificación de la región intergénica ITS1 e ITS2 ADNr del hongo	46
Secuenciación de los amplicones y análisis de secuencias	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
Actividad de quitinasas	48
La región Intergénica ITS1 e ITS2 ADNr de <i>Botrytis cinerea</i> fue amplificada a partir de ADN genómico obtenido de las bayas	50
CONCLUSIONES	54
LITERATURA CITADA	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo de la vid en el mundo	3
Figura 2. Esquema de la flor de vid y sus partes	9
Figura 3. La baya y sus partes	11
Figura 4. Porciones del racimo analizadas por Holz <i>et al.</i> , 2003	14
Figura 5. Esquemas de la flor de vid y las regiones por donde penetra y permanece en latencia <i>B. cinerea</i>	14
Figura 6. Racimo del cultivar Flame Seedles	21
Figura 7. Racimo del cultivar Princess Seedles	21
Figura 8. Racimos de Flame Seedless con síntomas de pudrición de racimos ..	22
Figura 9. Racimos de Princess Seedless con síntomas de pudrición de Racimos	22
Figura 10. Aislamiento e identificación del hongo de las porciones de racimo Analizadas	28
Figura 11. Imágenes al microscopio de luz de los cortes histológicos de los tejidos inoculados en campo	31
Figura 12. Imágenes del microscopio de luz con el proceso de infección en el tejido basal de las bayas	32
Figura 13. La Baya y su región estilar	33
Figura 14. Porciones del racimo y baya analizados	35
Figura 15. Grafica de Actividad Enzimática de Quitinasas determinada por el ensayo fluorométrico	50
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos con los iniciadores específicos para la región intergénica de <i>B. cinerea</i>	52
Figura 17. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los amplicones obtenidos del ADN genómico de las bayas maduras 18SARNFw y 18SARNRv.....	53

RESUMEN

La identificación del agente causal de la pudrición de racimos de la vid en uva para mesa en Sonora, ha permanecido sin determinar a través de los años. Con el objetivo de identificar el agente causal de la pudrición de racimos de la vid (*Vitis vinifera* L.) para mesa y establecer su patogenicidad, se analizaron racimos de uva durante la cosecha y empaque, en viñedos de la región de Hermosillo, Sonora. De los tejidos analizados se aisló el hongo, que se caracterizó morfológica y moleculannente mediante la prueba de PCR, como *Botrytis cinerea* Pers. La etiología de la pudrición de racimos de la vid, se confirmó mediante la inoculación artificial de suspensión de esporas del hongo en racimos de los cultivares Flame Seedless y Princess Seedless en las etapas de prefloración, floración y postfloración. El proceso infectivo del hongo se determinó mediante el seguimiento histológico, encontrándose que la germinación de las esporas y elongación de los tubos germinativos se produce de 48 a 72 horas después de la inoculación (DDI) y la infección a partir de las 96 horas DDI, en la porción basal de las bayas. Se monitoreó la actividad de la enzima quitinasa durante el proceso de infección, y se encontró que dicha enzima no es inducida por *Botrytis* en las bayas. También se comprobó la infección latente de *Botrytis* t n bayas de ambos cultivares, mediante la prueba de PCR. Esto indica que el rnanejo de *Botrytis* en los viñedos comerciales, deberá ser un punto de atención para evitar las pudriciones postcosecha.

ABSTRACT

Identification of the causal agent of bunch rot disease in table grapes at the Sonoran Desert had been remaining elusive for many years. In order to identify the causal agent of bunch rot of grapevine in table grapes, and establish its pathogenicity, samples of grape clusters during harvest and packing process were analyzed in vineyards of Hermosillo area. A fungus was isolated from analyzed clusters, which was morphologically and molecularly characterized as *Eutypa cuneata*. To confirm the etiology of the bunch rot, artificial inoculations of conidia suspensions of the fungus were done in the Seedless and Princess Seedless cultivars during pre-flowering, flowering and post-flowering stages. Cluster samples were taken and fixed at different time intervals for histological analysis. Conidial germination and tube elongation was observed in tissue preparations 48 and 72 hours after inoculation (HAI), the infection was observed to occur after 96 hours HAI, along the basal portion of the berry. Chitinase enzymatic activity was monitored during the process of infection but no detectable activity was observed. Likewise, latent infection of *Eutypa* was verified in berries of both cultivars by PCR test.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

Cultivo de la vid en el Mundo

La vid es el cultivo frutal más ampliamente distribuido en el mundo. Las uvas ocupan el octavo lugar como alimento de mayor consumo y toda la fruta proviene de la especie *Vitis vinifera* L. Ésta se cultivó por primera vez al sur de los mares Caspio y Negro, en la región de Asia Menor, de allí, los fenicios la llevaron a Grecia, Roma y Francia. Desarrolla tanto en regiones de clima templado como tropicales, predominando su cultivo en zonas templadas. Su distribución se restringe al cinturón geográfico comprendido entre los paralelos 30° y 45° de los hemisferios norte y sur. Con el descubrimiento del nuevo mundo, Hernán Cortés la introdujo a lo que hoy es la República Dominicana y posteriormente a México y Perú; se dispersó de Norte a Sudamérica, Sudáfrica y después Australia; encontrando un clima propicio en EE.UU., Chile y Argentina (Nelson, 1985; Pijpers *et al.*, 1986; Pearson y Goheen, 1988, Márquez-Cervantes *et al.*, 2000) (Figura 1).

Producción de la vid para mesa

La uva de mesa es la tercera fruta fresca más vendida en el mundo después del plátano y la manzana. Es uno de los productos que a nivel mundial ha tenido un auge exportador en las últimas dos décadas. Países del hemisferio sur entre los que están: Chile, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Australia y Argentina, han estado compitiendo por el acceso a los mercados del hemisferio norte con

su oferta de uvas frescas. Italia es el principal país exportador mundial de uvas, en Europa, mientras que EE.UU. lo es en Norteamérica y Chile en Sudamérica. El consumo *per capita* en EE.UU., subió de 2.85 Kg. por año en 1986 a 3.45 Kg. en 1997. El valor de las exportaciones mundiales de uva de mesa en el año 2001 fue de 2,500 millones de dólares (Miranda, 2003).

La producción de México representa el 0.9% a nivel mundial, mientras que la producción de Sonora corresponde al 77% de la producción nacional; con un valor de producción de aproximadamente 225 millones de dólares (AALPUM, 2003), generando el 30% (4.9 millones) de los jornales de la agricultura de Sonora y con esto los beneficios de las agroindustrias, cuartos fríos y el valor de los viñedos (Márquez-Cervantes *et al.*, 2000).



Figura 1. Cultivo de la vid en el mundo (<http://www.enoforum.com/2004>).

En 1920, las primeras plantaciones en Sonora, se hicieron con barbados de la variedad Mission provenientes de Loreto, B. C. En 1950-1960 se efectuaron plantaciones de las variedades Thompson Seedless, Cardenal, Carignane, Grenache y Mission con propósitos de uso en la industria vitivinícola. A mediados de los sesentas, la variedad Cardenal se cultivó como opción de uva de mesa para el mercado de la Ciudad de México estableciéndose también con este propósito las primeras hectáreas en la región de Pesqueira, Sonora. Para 1980, se produjeron 2 millones de cajas en una superficie de 3,000 ha. En 1984 entra en vigor el "Marketing Order" sobre estándares de calidad para las importaciones de uva de mesa en Estados Unidos, apoyando en forma positiva a la uva mexicana (Márquez-Cervantes *et al.*, 2000).

Durante 2003, Sonora exportó hacia los mercados de EE.UU., Canadá y Europa, poco más de 20 millones de cajas producidas en alrededor de 13,000 ha., en los municipios de Hermosillo y Caborca, con cultivares tanto de uvas blancas como de color, entre los que destacan: Perlette Seedless, Flame Seedless, Sugraone, Red Globe, Black Seedless y Princess Seedless (AALPUM, 2003).

Putridión de racimos

La pudrición de racimos de la vid, de importancia en viñedos cultivados en regiones con climas húmedos y fríos del mundo; conocida también como pudrición gris, es asociada al hongo *Botrytis cinerea* Pers., el cuál provoca

marchitez de brotes, caída de racimos en formación y pudrición de las bayas en postcosecha. Es la principal enfermedad de los frutos de la vid durante la cosecha y postcosecha (McClellan *et al.*, 1973b, Flaherty *et al.*, 1981). En California, USA, McClellan y Hewitt (1973a), denominaron por primera vez la enfermedad como pudrición temprana de la vid por *Botrytis*, debido a que estudiaron el proceso infeccioso y establecieron que el hongo penetra a la planta en etapas tempranas de desarrollo y una vez que ha penetrado, a través del estigma de la flor, desarrolla una infección latente en espera que las bayas, una vez maduras, acumulen azúcar y en la cosecha; al aplicar temperaturas inadecuadas para su conservación y mercadeo, el hongo reactiva su desarrollo causando, la pudrición de racimos.

La pudrición de racimos es la enfermedad de postcosecha más destructiva de las uvas para mesa, especialmente en los cultivares tardíos expuestos a lluvias ó alta humedad. Otros problemas en postcosecha, causados por hongos como *Cladosporium*, *Alternaria* y *Stemphyllium* pueden desarrollar durante el almacenamiento pero su importancia es mínima comparada con *Botrytis*. Las bayas, con el hongo en forma latente, que quedan en las cajas durante la cosecha, provocan más tarde la infección de las demás bayas, causando pudriciones en postcosecha. Durante el almacenamiento en frío, el hongo que se encontraba en forma latente, se activa y continúa desarrollando dentro de las bayas aún fumigadas con dióxido de azufre y después de un período de tiempo, las pudriciones se hacen evidentes,

posteriormente se dan las infecciones secundarias con la diseminación del hongo hacia las bayas adyacentes sanas (Peacock y Smilanick, 1996).

Las infecciones latentes se originan a partir de la germinación de las esporas y penetración de la superficie de la baya, pero el hongo permanece en reposo hasta que las bayas maduran; aunque no se requieren heridas en las bayas para aumentar la infección, si estas se provocan al momento de la cosecha bajo condiciones de humedad, la infección es mayor. Las uvas de mesa tardías son susceptibles a *Botrytis* durante períodos lluviosos ó de alta humedad y a temperaturas en el rango de 12-25°C, observándose las infecciones a los 5 ó 7 días después. Retrazar la cosecha 5-7 días después de clima húmedo permite identificar y separar las bayas infectadas, sin embargo los niveles de bayas dañadas incrementan la pudrición de postcosecha durante el almacenamiento (Peacock y Smilanick, 1996).

Holz *et al.*, (1997) y (2003) y Coertze y Holz (2002), reportaron en Sudáfrica, la presencia de *Botrytis* en diferentes porciones de los racimos y partes de las bayas; detectándolo en la base de las bayas y el pedúnculo; pero no en el estigma de la flor, indicando que las bayas inmaduras son resistentes e inhiben de alguna forma el desarrollo del hongo, permaneciendo latente en el receptáculo floral y base de las bayas en desarrollo; pero cuando maduran y son sometidas a temperaturas inadecuadas durante cosecha y postcosecha, se vuelven susceptibles al reactivar el hongo su infección. Keller *et al.*, (2003) y Viret *et al.*, (2004), aportaron por primera vez evidencias (mediante el

seguimiento histológico de la infección, utilizando microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido y de transmisión), de la infección a través de la cicatriz de la caliptra y receptáculo floral durante la floración y la infección latente de *Botrytis* en la base de las bayas, en tanto estas llegan a la madurez, destacando su importancia potencial como fuente de pudriciones de racimos durante postcosecha.

Zitter y Wilcox, (2004), probando diferentes formas de raleo de racimos y su influencia en el desarrollo de la infección por *Botrytis* en vid, desde la floración, desarrollo de las bayas, cierre del racimo y envero; encontraron que el 70-90% de las bayas desarrollaron infecciones latentes, permaneciendo inactivas en tanto no maduraban. Destacando así, la importancia de las infecciones florales latentes, al permitir el establecimiento del hongo en el racimo y ser fuente de pudriciones en postcosecha.

En Sonora, la pudrición de racimos de uva para mesa se presenta al momento de la cosecha (mayo y junio), cuando los racimos se someten a temperaturas de almacenamiento, antes y durante su transporte al mercado final. Las condiciones prevalecientes en el estado, bajo las cuales se cultiva la vid para la industria, en las diferentes regiones, cuya cosecha durante los meses de julio y agosto; coincide con condiciones de temperatura y humedad desfavorables para el desarrollo del hongo, han hecho que se descarte a *Botrytis*, como el agente causal de la pudrición de racimos. Otros hongos como:

Aspergillus sp., *Penicillium sp.*, *Alternaria sp.* y *Rhizopus sp.*, se han reportado como los causantes de la pudrición de racimos (Gardea-Béjar *et al.*, 2004).

Jiménez-León, 1984 y Valenzuela-Cornejo, 1986, en investigaciones realizadas en viñedos de la región de la Costa de Hermosillo, con cultivares de uva industrial reportaron como causante de la pudrición de racimos al hongo *Diplodia natalensis*, y concluyeron que se requieren condiciones ambientales especiales de temperatura y humedad relativa para el desarrollo de *B. cinerea*, descartándolo como causante de la pudrición de racimos en la región de Hermosillo. Estableciendo que la humedad relativa y la disponibilidad de agua libre sobre la superficie de las plantas, son los principales factores que influyen en la germinación de las esporas del hongo para infectar las bayas.

Sin embargo, el cambio de explotación de la uva para la industria a uva para mesa y aprovechar la oportunidad de comercialización de la misma hacia la exportación, durante mayo y junio, han hecho que el productor aplique prácticas agronómicas que adelantan la brotación, desarrollo y floración de la vid, haciendo coincidir esta, con condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa favorables para la infección por *Botrytis*.

Características morfológicas de la vid

La flor es hermafrodita, y está formada por cinco sépalos fusionados, cinco pétalos unidos de su extremo (caliptra), cinco estambres y dos lóbulos en el pistilo con estilo y estigma cortos, las flores están organizadas en una inflorescencia que inicia su formación el año anterior a su floración y se

adhieren al raquis del racimo por el pedicelo, el que en su extremo contiene el receptáculo floral, que finalmente se convertirá en la base de la baya (Pratt, 1971) (Figura 2).

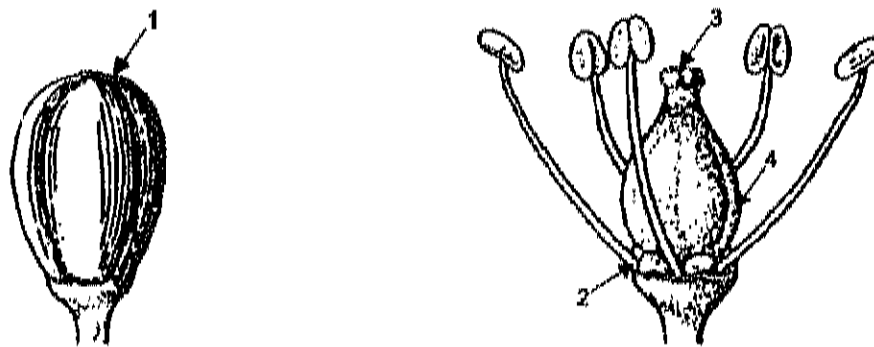


Figura 2. Esquema de la flor de vid y sus partes: Caliptra (1), Receptáculo y cicatriz de la caliptra (2), Estigma (3) y Ovario (4), Keller *et al.*, 2003.

La baya constituye la parte comestible del racimo de vid, cuyas características morfológicas son de gran importancia (Figura 3). La baya se forma a partir del ovario y las semillas desarrolladas, en el caso de variedades pirénicas (con semilla) y en las variedades apirénicas, a partir del ovario desarrollado (Dokoozlian *et al.*, 1999). Las bayas constituyen el 96% del peso fresco total en los racimos cosechados del cultivar Flame Seedless (Gardea-Béjar *et al.*, 1994). Las bayas para consumo en fresco son de mayor tamaño que las utilizadas para el proceso de vinificación o pasa (Nelson, 1991). El tamaño de la baya y el color son los parámetros más importantes que determinan la calidad del fruto en la uva de mesa. Existen muchas variables

que influyen en el grado de desarrollo y tamaño de las bayas, tales como el genético, ambiental y las prácticas culturales (Dokoozlian *et al.*, 1999).

La pulpa de la baya está constituida por el pericarpio o pared del ovario maduro. El pericarpio consta de tres diferentes tejidos: exocarpio (cutícula), mesocarpio (pulpa) y endocarpio (capa interna de la pulpa o mesocarpio que rodea la pared interna del ovario) (Figura 3). El exocarpio o piel de la baya esta formado por: epidermis e hipodermis. La epidermis presenta una capa gruesa de células con una capa de cutina y cera en su superficie externa. La hipodermis posee de cuatro a seis capas gruesas de células y se encuentra dentro de la epidermis. Las paredes engrosadas de las células de estos tejidos, incrementan su resistencia mecánica, pero le permiten extenderse y crecer (Dokoozlian *et al.*, 1999).

El mesocarpio o pulpa del fruto se compone de células de parénquima con paredes delgadas que le permiten su expansión al acumular azúcar, agua y otros constituyentes, durante la maduración de la baya (Pratt, 1971). Las células que conforman el endocarpio, contienen cristales de oxalato de calcio, a través de los cuales se elimina el ácido oxálico, que es una sustancia tóxica, presente en las mismas (Dokoozlian *et al.*, 1999).

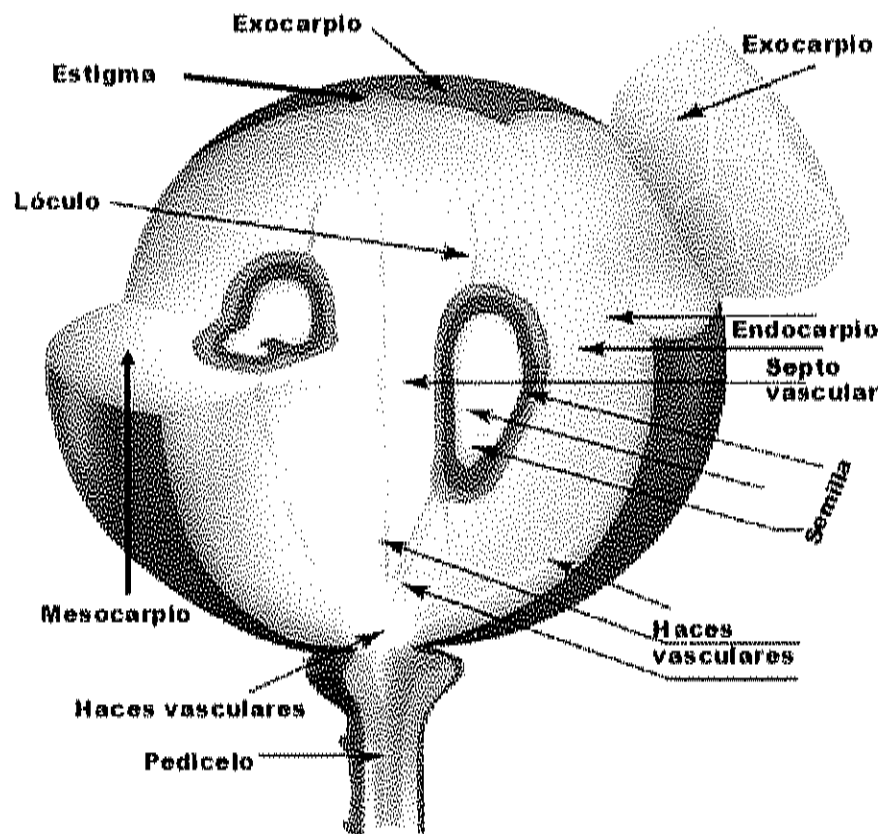


Figura 3. La baya y sus partes (Coombe, 1987; Kennedy, 2002).

Botrytis cinerea, agente causal de la pudrición de racimos de la vid

Este microorganismo es uno de los patógenos fungosos más importantes del mundo, se le ha reportado en más de 230 hospederas, donde se incluyen cultivos anuales, hortalizas y frutales, económicamente importantes. En vid frecuentemente, se le observa en bayas maduras próximas a la cosecha, después de lluvias o periodos prolongados de alta humedad, produciendo lo que también se conoce como pudrición gris. El control de *Botrytis* en vid es un desafío, debido a sus características biológicas, su adaptabilidad a diferentes

condiciones ambientales, su potencial destructivo durante la cosecha y el desarrollo de resistencia a fungicidas. *B. cinerea*, es un saprofito oportunista que aprovecha las partes florales senescentes para invadir su hospedera; las infecciones en floración están relacionadas con las partes florales dehiscentes y se han reportado en muchos frutos diferentes tales como fresa, kiwi, frambuesa, cereza, tomate, manzana, pera, ciruela y nectarina (Verhoeff, 1980; Viret *et al.*, 2004).

El desarrollo epidemiológico de la pudrición gris en vid está bien documentado, algunos eventos, como la latencia hasta el envero, después de la infección en floración, permanecen en discusión. En particular aún se desconoce la ruta de la infección y el sitio donde el hongo permanece en estado quiescente en las bayas jóvenes. Después de la caída de la caliptra (los cinco pétalos de la flor que se fusionan para formar una funda protectora), cuando inicia la floración en las vides, los estambres se abren y liberan el polen sobre el estigma y se lleva a cabo la germinación del tubo polínico que penetra el estigma y desarrolla hacia abajo a través del estilo hasta el óvulo maduro. McClellan y Hewitt, (1973a), describieron esta ruta estilar de infección por *B. cinerea* a partir de experimentos de campo, como la ruta de infección responsable de la pudrición temprana de la vid por *Botrytis*. En fresa y frambuesa, la infección se lleva a cabo en el receptáculo, por las heridas que dejan los estambres al caer, aunque también puede ocurrir a través del estilo floral (Jarvis, 1980b). En contraste con estos resultados, Viret *et al.*, (2004),

analizaron, las infecciones estilares en 61 especies de plantas y no encontraron a *B. cinerea* dentro de los óvulos, debido a secreciones en la superficie del estilo que impiden la germinación de los conidios. Consideró que algunos compuestos internos inhiben el crecimiento fungoso pero no la elongación del tubo germinativo del polen.

Keller *et al.*, 2003, señalaron que la infección se lleva a cabo en la base de los estambres, en el área del receptáculo, debido a que no encontraron al hongo en el estigma floral; lo comprobaron bajo condiciones de campo después de inocular las flores de vid, donde originalmente habían detectado infecciones latentes en el receptáculo por *B. cinerea*; confirmando los resultados obtenidos por Holz *et al.*, (1997) en uvas de mesa.

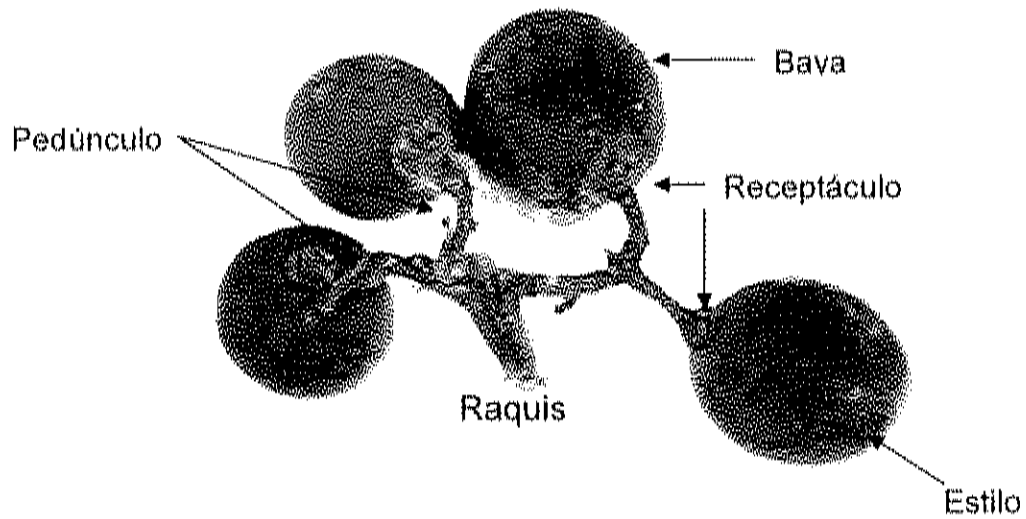


Figura 4. Porciones del racimo analizadas por Holz *et al.*, 2003, de donde lograron aislar y detectar infección en latencia de *B. cinerea*.

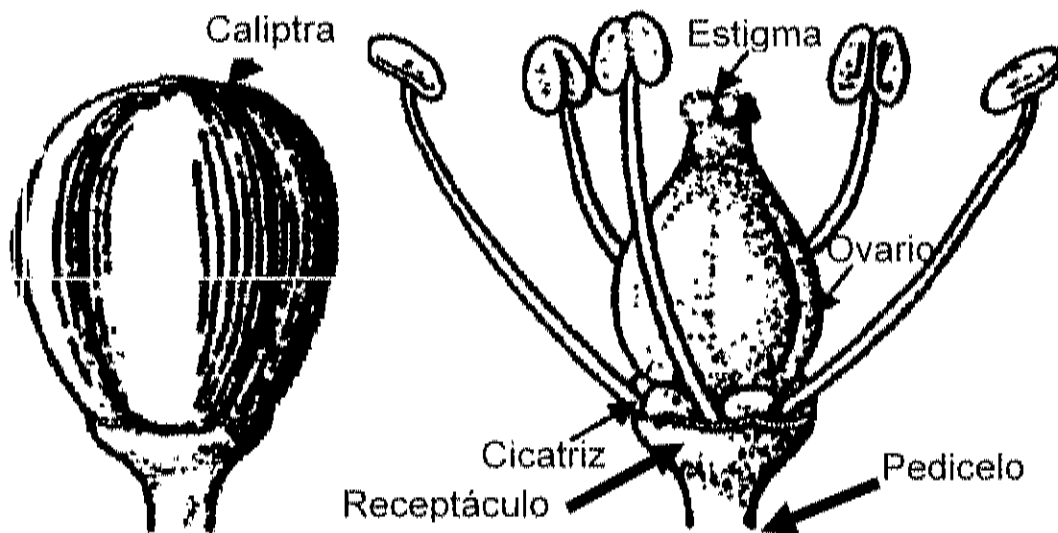


Figura 5. Esquemas de la flor de vid y las regiones por donde penetra y permanece en latencia *B. cinerea* (receptáculo y cicatriz de la caliptra), según Viret *et al.*, 2004.

El presente estudio se realizó bajo las siguientes premisas:

HIPÓTESIS

Botrytis cinerea esta asociado a la pudrición de racimos de uva para mesa en la etapa de postcosecha, bajo las condiciones de cultivo en los viñedos de Hermosillo.

OBJETIVOS

GENERAL

Establecer la evidencia del agente causal de la pudrición de racimos de uva para mesa, bajo las condiciones de cultivo en la región de Hermosillo, Sonora.

ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar las especies de patógenas asociadas a la pudrición de racimos de vid para mesa en postcosecha en la región de Hermosillo, Sonora.
- Llevar a cabo el aislamiento del agente causal y en su caso caracterizar morfológica y molecularmente la especie presente.
- Establecer *in vivo* la infección mediante inoculaciones artificiales.
- Realizar el seguimiento histológico y químico del proceso infectivo.
- Caracterizar molecularmente la latencia del hongo.

CAPÍTULO II

ETIOLOGÍA DE LA PUDRICIÓN DE RACIMOS EN UVA PARA MESA EN VIÑEDOS DE HERMOSILLO

RESUMEN

A nivel mundial y desde hace algunos años, se determinó que el hongo *Botrytis cinerea* Pers. es el agente causal de la pudrición de racimos en vid, ó pudrición gris por la coloración grisácea caracterfstica que imparte a los racimos enfermos. *Botrytis* es un hongo que desarrolla favorablemente, bajo condiciones de clima frío y humedad relativa de 80-90%, en las diferentes regiones vitícolas del mundo, causando fuertes perdidas en el rendimiento de las vides al provocar la muerte de brotes y hojas jóvenes y caída de racimos en formación durante todo el ciclo de producción. Así como también, pudrición de racimos de vid durante la cosecha, postcosecha y transporte de las uvas para mesa al mercado. La producción de vid para mesa de exportación, es una actividad importante para el desarrollo económico del estado; sin embargo en los últimos años, por las características de explotación de los viñedos, se ha observado la pudrición de racimos, durante la cosecha y postcosecha de los racimos. Por lo que el objetivo de esta investigación es determinar su etiología bajo las condiciones de cultivo de la vid para mesa en los viñedos de Hermosillo.

ANTECEDENTES

La pudrición de racimos de la vid (*Vitis vinifera* L.), causada por el hongo *Botrytis cinerea* Pers., conocida también como pudrición gris, es una enfermedad de importancia considerable ya que limita el rendimiento y calidad de las uvas. Es de distribución mundial y particularmente es severa en climas húmedos y fríos, desde la brotación hasta la cosecha y postcosecha. En California, EE. UU., es problema serio en los valles costeros cuyo clima frío y la humedad del mar, resultan favorables para el desarrollo de la enfermedad. Asimismo, el microclima dentro del viñedo, la forma y estructura del racimo son variables importantes que determinan la severidad de la pudrición de racimos en el campo (Vail y Marois, 1991).

Las diferencias en susceptibilidad a la pudrición de racimos por *Botrytis* entre los cultivares de vid, se basan en las características morfológicas de los racimos, la anatomía de la cutícula de las bayas y su composición química, ya que la vid sintetiza fitoalexinas cuya concentración se relaciona con la resistencia a enfermedades. No se han establecido diferencias entre cultivares ya sea de producción temprana ó tardía, blancos ó de color, debido a que depende de las condiciones favorables para su infección (Pearson y Goheen, 1988).

B. cinerea es un patógeno destructivo de las uvas y otras frutas pequeñas, su infección en vid se relaciona con uvas maduras después de lluvias al final de la estación de producción ó periodos prolongados de alta humedad relativa. En fresa y frambuesa *Botrytis*, infecta partes florales senescentes a principios de la estación de crecimiento y permanece en latencia hasta finales de la estación ó la cosecha, cuando reinicia su desarrollo y lleva a cabo la pudrición de los frutos (Jarvis, 1980b).

McClellan y Hewitt, (1973a) y McClellan *et al.*, (1973b), basados en la forma de infección y el momento del desarrollo de la pudrición, distinguieron dos tipos de pudrición de racimos por *Botrytis* en vid: la pudrición común y la pudrición temprana, relacionando la pudrición común por *Botrytis* con uvas maduras expuestas a lluvias al final de la temporada y la pudrición temprana por *Botrytis* en uvas jóvenes con infecciones antes del envero; basándose en la hipótesis que la infección de la pudrición temprana se lleva a cabo durante la floración a través del estigma y extremo del estilo de la flor, y que el hongo permanece latente hasta la maduración de las uvas. Mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, sin aportar evidencias, concluyeron que *Botrytis* penetra durante la floración a través del estigma y desarrolla en forma latente hasta que la baya madura y lleva a cabo la pudrición de los racimos en la cosecha.

La necesidad de explotar otros mercados, más allá del de los EE. UU., para exportar la producción de uva para mesa de Sonora, ha exigido que se implementen tecnologías, prácticas de cultivo y manejo postcosecha para

extender la temporada de comercialización. Sin embargo, en los últimos años, esto ha traído como consecuencia un incremento en la incidencia de la pudrición de racimos, ya que al promover la brotación, desarrollo, floración y fructificación temprana de la vid se le hace coincidir, con las etapas críticas para la pudrición de racimos ya que también coinciden las condiciones ambientales favorables de finales del invierno en la región, que propician el establecimiento del problema. A pesar que en la actualidad, no se cuenta con estudios que establezcan la presencia de *Botrytis* como causante de la pudrición de racimos en vid para mesa en la región, se especula con ello; considerando las condiciones ambientales predominantes de clima seco y caliente, otros hongos se han reportado, tales como *Aspergillus sp.*, *Alternaria sp.*, *Penicillium sp.* y *Rhizopus sp.* (Gardea-Béjar *et al.*, 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo. Durante la cosecha de vid para mesa, en el año 2002, se colectaron al azar, de los empaques de los viñedos de Hermosillo, racimos de los cultivares Flame Seedless y Princess Seedless; una vez cosechados empacados y almacenados a 20°C antes de su transporte al mercado. Los racimos, sin síntomas visibles, se trasladaron para su análisis al laboratorio de Calidad del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD, A.C.) (Figuras 6 y 7).



Figura 6. Racimo del cultivar Flame Seedless.



Figura 7. Racimo del cultivar Princess Seedless.

Aislamiento. Porciones de racimo intactos, raquis, pedúnculos y bayas previamente desinfectados mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 5% (NaOCl) por 3 min, se colocaron en cámaras húmedas (toallas de papel estériles humedecidas con agua estéril en cajas Petri estériles) con el propósito de obtener esporulación, se incubaron a 20°C. Una vez obtenida ésta, se tomo una porción de micelio y esporas y se inocularon en cajas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), incubándose a 20°C. De las colonias formadas, se tomaron los conidios y se hicieron diluciones seriadas (1:10, 1:100, ..., 1:1,000,000) en agua destilada estéril y se inoculo 1 mL de cada dilución en cajas Petri con Agua-Agar e incubaron a 20°C por 24 h para obtener conidios germinados individualmente y posteriormente transferirlos a PDA a 20°C y así tener cultivos monoconidiales puros del hongo e identificar en su caso, cepas diferentes (Figuras 8 y 9).

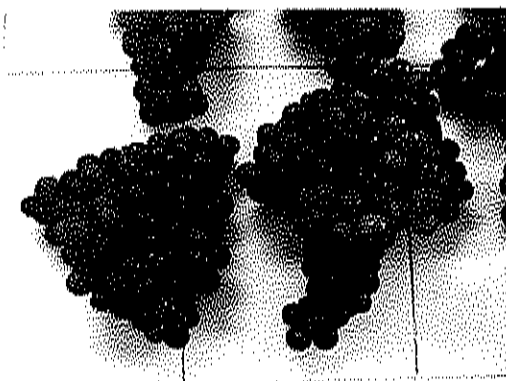


Figura 8. Racimos de Flame Seedless de donde se tomaron porciones y se colocaron en cámara húmeda.

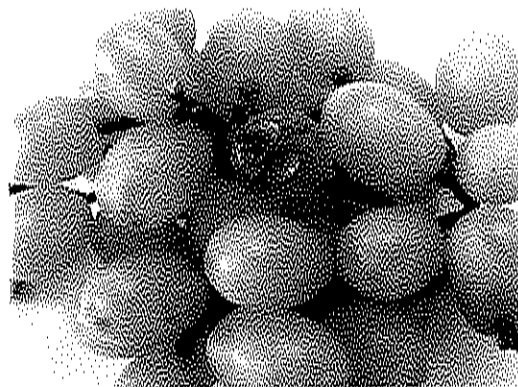


Figura 9. Racimos de Princess Seedless de donde se tomaron porciones y se colocaron en cámara húmeda.

Caracterización morfológica. Ésta se llevo a cabo aplicando las claves que para la identificación de hongos fitopatógenos reportan Jarvis, (1980a); Barnett y Hunter, (1998) y CAB Internacional, (2001).

Caracterización molecular. A partir de aislamientos monoconidiales de *B. cinerea*, se extrajo el ADN según lo reportado por Ahrens y Seemüller, (1992) mediante una electrofóresis en gel de agarosa al 1%, se evaluó su calidad y se cuantificó en un espectrofotómetro Perkin Elmer (Modelo Lambda Bio 10). Con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificó un fragmento de la región Intergénica ITS1+5.8S+ITS2 ARNr con el iniciador universal ITS1 (TCCGTAGGTAACCTGCGG) Y ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990).

Las reacciones de PCR por muestra con un volumen final de 25 μ L, fueron: 12.145 μ L de agua estéril deionizada, 20 ng de ADN problema, 4 μ L aislado de las bayas mediante el método de Lodhi *et al.*, (1994), buffer de reacción 1X, 2.75 μ L; 1.375 μ L de MgCl₂, a 1.5 μ M, agregando una mezcla de 2.2 μ L de dNTP a 0.2 μ M; y de cada iniciador 1.1 μ L a 10 pM y se añadió 0.33 μ L de Taq ADN polimerasa a 1.5 U. Las reacciones de PCR se corrieron en un termociclador Perkin Elmer Cetus Norwak (Modelo CT2400); bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial 30 ciclos de 4 min a 95°C, seguido por una hibridación y extensión de 95°C por 1min, 50°C por 30 seg y 72°C por 2min respectivamente; y un paso final de extensión of 10 min a 72°C. Los productos

amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y la banda se fotografió bajo luz UV.

Los productos de PCR se purificaron con un paquete QIAquick[®] PCR de acuerdo con las especificaciones de la compañía. Posteriormente, se secuenciaron en dos direcciones (5'→3' y 3'→5') en un secuenciador automático ABI 3700. Las secuencias se analizaron con el software Lasergene 2001[®], versión 5 de DNASTAR, Inc. (Anonymous, 2001) y comparados con una base de datos de GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) según Korf *et al.*, (2003). Se consideraron solo los valores cuantitativos más altos generados por el programa. Las primeras secuencias, se alinearon con la secuencia de este estudio mediante alineación múltiple con el programa W Method de Lasergene (Anonymous, 2001). La secuencia se depositó en el NCBI, con el número de acceso AY568636.

Inoculaciones artificiales *in vivo*. Con el propósito de corroborar la patogenicidad del hongo aislado, a inicios de la estación de crecimiento del cultivo, durante 2003, se seleccionó un viñedo con dos lotes separados de los cultivares Flame Seedless y Princess Seedless y se realizaron inoculaciones artificiales del hongo a racimos de cada cultivar durante las etapas de prefloración, floración y postfloración. Se señaló el área a tratar en cada cultivar, tomándose 9 plantas con 25 racimos por cada tratamiento y se marcaron con cintas de plástico de colores para su identificación. Cada inoculación se efectuó con una suspensión de esporas de *B. cinerea* de 3×10^5 conidios por mL en una

solución de glucosa al 3%; la concentración de conidios en solución se determinó con un hematocitómetro. Se utilizaron como controles negativos o testigos, racimos asperjados con agua destilada estéril (Waller *et al.*, 2002).

Histopatología. A fin de determinar el proceso infectivo del hongo, se tomaron porciones de los racimos inoculados de cada cultivar con cinco repeticiones, incluyendo los testigos, a las 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación y así sucesivamente cada 10 días hasta la cosecha. Las muestras se colocaron en envases herméticos con fijador FAA (alcohol etílico absoluto 500 mL, formaldehído 40% 100 mL, ácido acético glacial 50 mL y agua destilada 350 mL). Al final de la cosecha, las muestras así preservadas se procesaron en el laboratorio de Histopatología Vegetal, del Instituto de Fitosanidad (IFIT) del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México. Las muestras se lavaron y se separaron en raquis, pedicelo, pedúnculo y bayas. Se deshidrataron gradualmente en soluciones progresivas de alcohol etílico 50, 70, 96, 100%, xileno 100%, xileno tres cambios. Se infiltraron en Paraplast regular (Sigma Chemical Co., USA) en un cambiador automático de tejidos (Tissue Tek II, Sakura Finetechnical mod. 4640-B). Finalmente se incluyeron en Paraplast nuevo; se hicieron bloques y se realizaron cortes de 8 μm con un micrótopo manual American Optical, se tiñeron con la coloración diferencial de safranina-verde rápido y ácido peryódico. De cada bloque de parafina se obtuvieron 10 portaobjetos, con 5 a 10 cortes cada uno para su observación al microscopio de

luz (Microscopio Micromaster marca Fisher Scientific con cámara digital Sony DSC-F717, Sony Co. Japon) (Dhingra y Sinclair, 1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestreo. En los racimos analizados, se encontró que únicamente aquellos, que habían sido previamente empacados y almacenados a 20°C, para su traslado al mercado, mostraron desarrollo de infección fungosa, lo que indica aparentemente, que la especie presente se encuentra en forma latente en el tejido y el proceso infectivo lo continúa una vez que la fruta madura se encuentra en proceso de comercialización.

Aislamiento. El hongo se obtuvo principalmente de las porciones de pedúnculo y base de las bayas de los racimos de los cultivares Flame Seedless y Princess Seedless, sin observarse diferencias en cuanto a susceptibilidad o resistencia. No se logró aislarlo del raquis o cualquier otro tejido. Para el aislamiento del hongo, el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) a 20°C de incubación, resultó ser el más apropiado. Los cultivos monoconidiales, no produjeron cepas diferentes del hongo, que estuvieran causando la pudrición de los racimos en la región (Figura 10).

Caracterización morfológica. Las claves aplicadas para el hongo aislado correspondieron a la especie *Botrytis cinerea* Pers., con conidióforos rectos de longitud indeterminada ramificados alternativamente con ramificaciones cortas de 10-30 μm de longitud y ápices esféricos gruesos de 8-10 μm de diámetro sobre los cuales se forman pequeños denticulos donde se originan conidios hialinos, individuales de forma oval ó elíptica de 8-12 μm de longitud,

acomodados en un racimo irregular. Aún cuando las características morfológicas, entre otras, la formación de esclerocios, sugerían a *B. cinerea* como el agente causal, se llevó a cabo la caracterización molecular para establecer la identidad plena del hongo aislado.

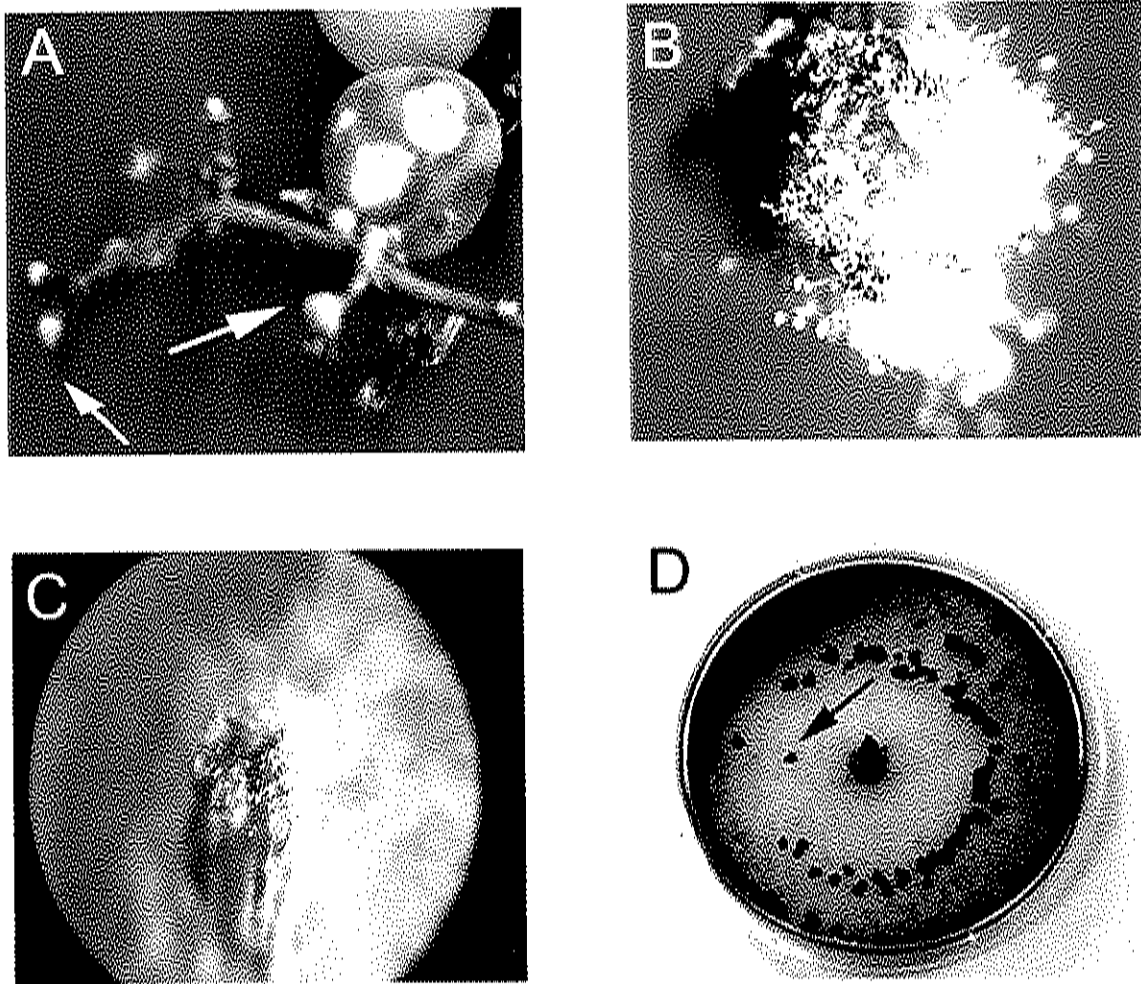


Figura 10. Aislamiento e identificación del hongo de las porciones de racimo analizadas. (A) Pedúnculo y base de las bayas, (B) Acercamiento de la punta del pedúnculo, (C) Acercamiento de la base de la baya y (D) Desarrollo del hongo (micelio y esporas) en medio de cultivo PDA con formación de esclerocios.

Caracterización molecular. El ADN total aislado tuvo un peso molecular aproximado de 12.2 Kb, mientras que el tamaño del producto amplificado por PCR fue de 600 pb. La secuencia de nucleótidos total fue de 492 pb. El ADN fue secuenciado en ambas cadenas, sin ninguna ambigüedad, y correspondieron a la secuencia completa de ambas regiones de ITS y fragmentos de los genes ribosomales. La secuencia nucleotídica obtenida se alineó con la secuencia de *B. cinerea* anteriormente determinada (no. acceso Z73765). La comparación indicó que eran 100% idénticas, asegurando que la identificación era correcta.

Inoculaciones artificiales *in vivo*. La suspensión de esporas en la solución de glucosa fue el vehículo apropiado para la infección, y así mismo, la cantidad de inóculo resultó suficiente para cubrir los tejidos en las etapas de prefloración, floración y postfloración, en ambos cultivares. Para determinar la infección latente del hongo en el tejido inoculado; dado que no fue posible observar síntomas y reaislar y reinocular al hongo, se aplicó la prueba de PCR, a extractos de bayas inoculadas, detectándose efectivamente la presencia del hongo.

Histopatología. El análisis al microscopio de luz de las preparaciones teñidas comprobó que el inóculo se acumuló principalmente alrededor de la cicatriz de la caliptra (receptáculo) y no sobre el estigma de la flor. Los conidios germinaron después de las 48 a 72 h después de la inoculación (DDI), observándose los tubos germinativos desarrollando paralelamente a la

epidermis del tejido antes de penetrar. Esto sucedió después de las 96 h DDI. Se observó que la penetración se realizó en forma directa a través de las células epidérmicas del receptáculo, por medio de la punta del tubo germinativo de la espora. No se observó la formación de apresorio. Después de la penetración, la hifa infectiva creció solo debajo de la cutícula ó entre las células de la epidermis, excepto en las células que se encuentran alrededor del sitio de infección (Figuras 11 y 12).

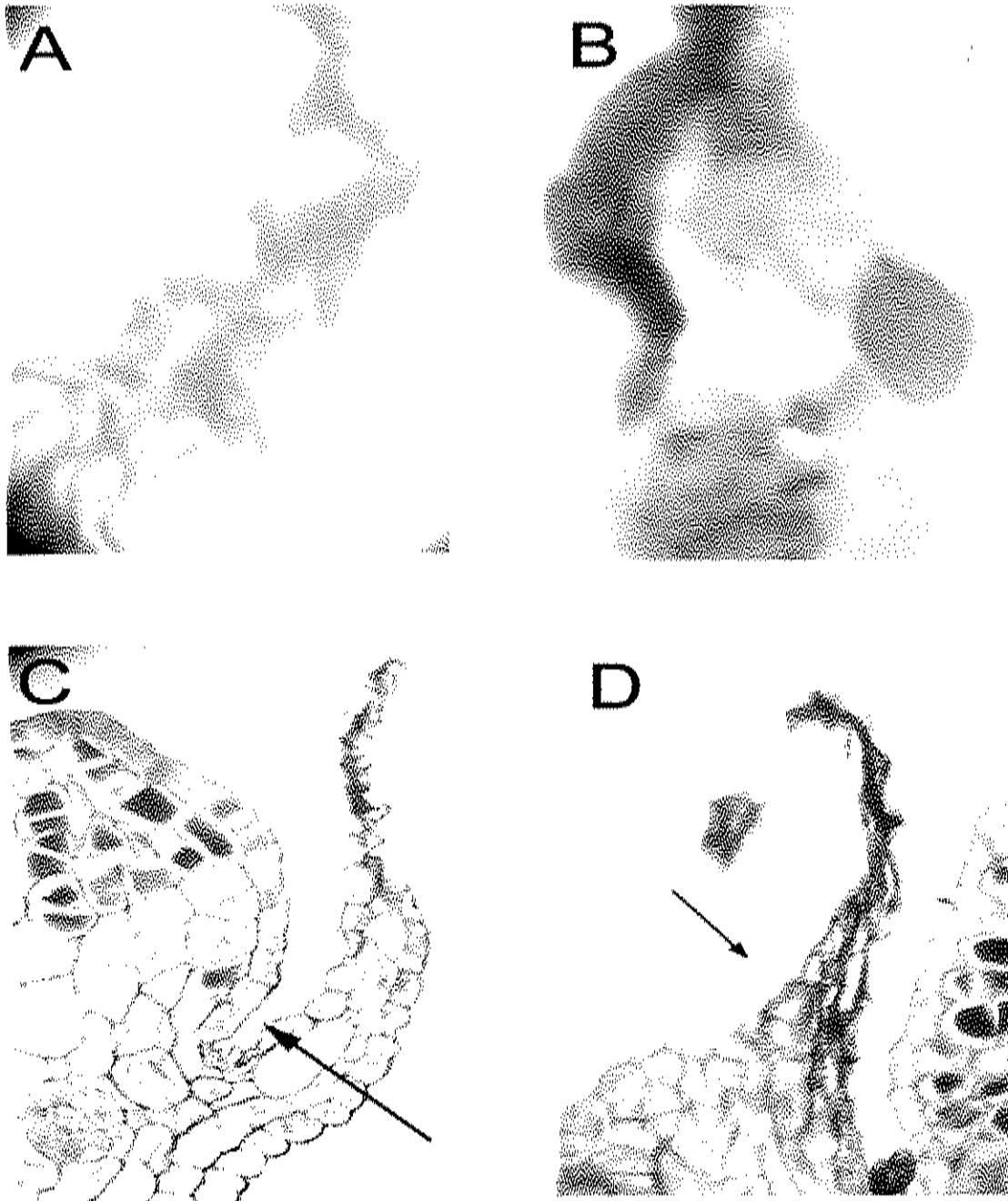


Figura 11. Imágenes al microscopio de luz de los cortes histológicos de los tejidos inoculados en campo, (A) y (B) esporas alrededor del tejido antes de germinar y (C) y (D) porción basal de la flor con tejido senescente donde se localizó la mayor cantidad de inoculo.

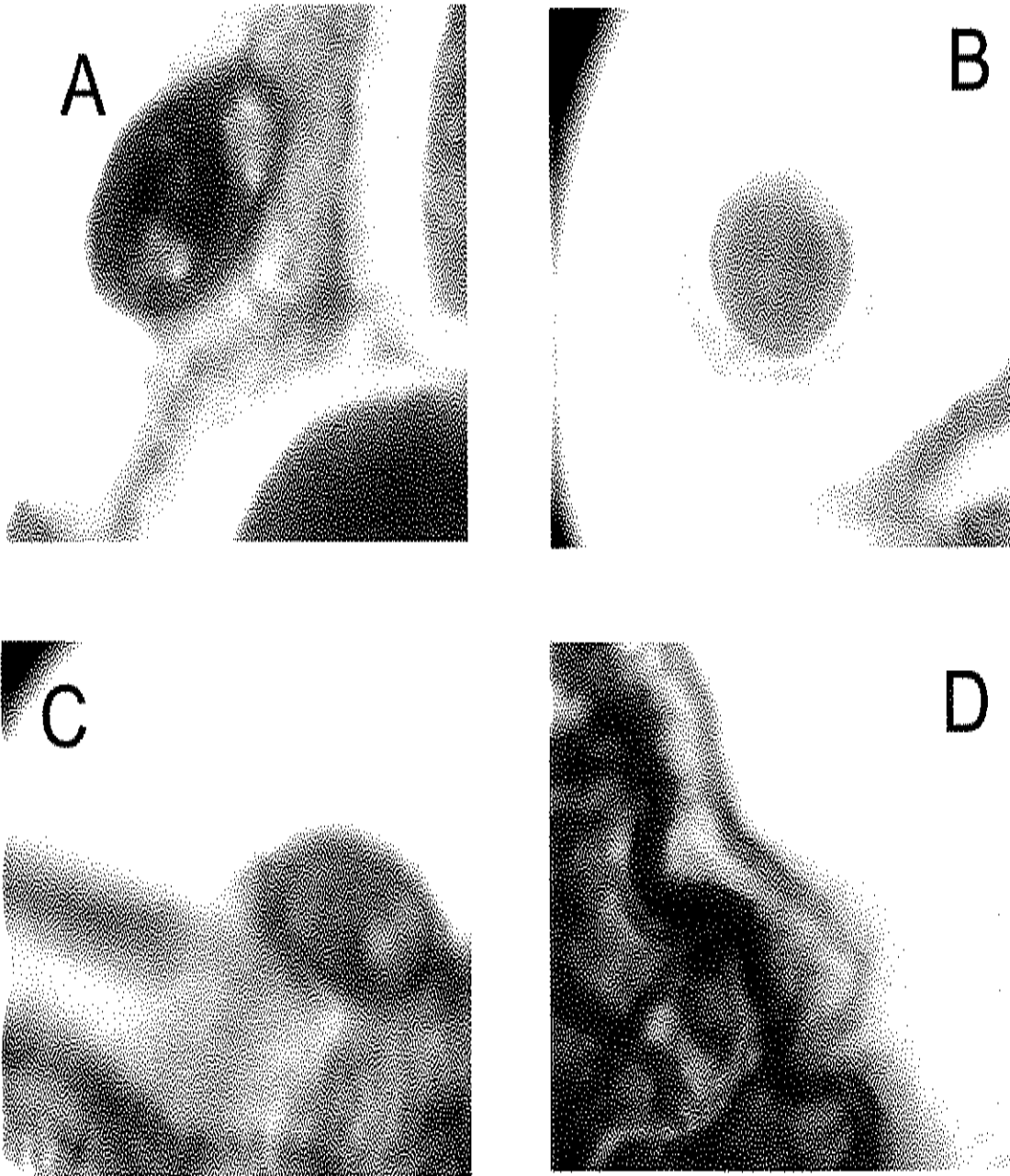


Figura 12. Imágenes del microscopio de luz con el proceso de infección en el tejido basal de las bayas, (A) y (B) germinación de la spora y emisión del tubo germinativo, (C) y (D) elongación del tubo germinativo y penetración de la hifa a través de la epidermis del tejido.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, demostraron que el hongo *Botrytis cinerea* es el causante de la pudrición de racimos en vid de mesa en los viñedos de Hermosillo y además se encontró que no hubo diferencias entre los cultivares inoculados. Así mismo se encontró que la infección ocurre durante las etapas de prefloración y floración, cuando las condiciones ambientales de temperatura y humedad le favorecen ya que durante esas etapas, predominan en la región condiciones ambientales de frío y humedad favorables para el hongo. Estas condiciones coinciden con lo reportado por McClellan y Hewitt (1973a), en California, U. S. A., quienes denominaron la enfermedad como pudrición temprana de los racimos por *Botrytis*; ya que al monitorear la infección en diferentes etapas de desarrollo del racimo, determinaron que el hongo penetra por el estigma de la flor y permanece latente en los tejidos de la flor para posteriormente causar la pudrición de los racimos durante la cosecha (Figura 13).

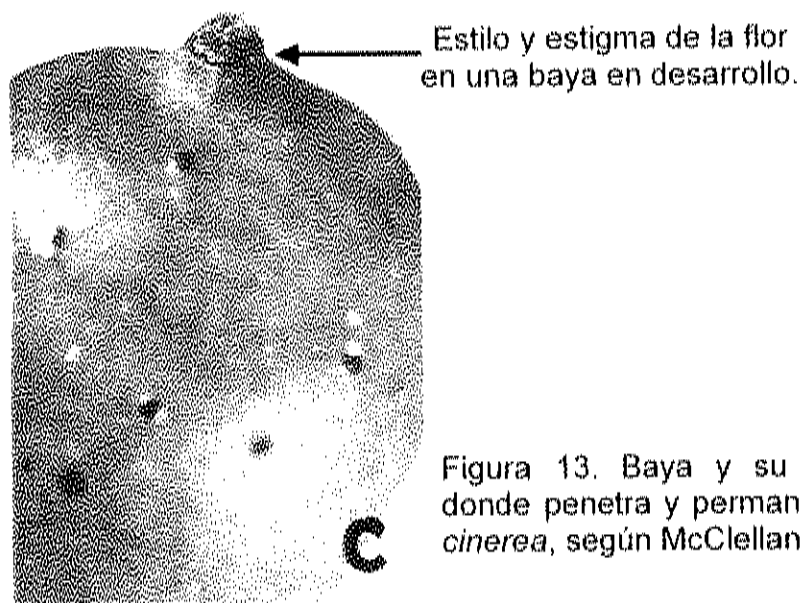


Figura 13. Baya y su región estilar por donde penetra y permanece en latencia, *B. cinerea*, según McClellan y Hewitt, 1973a.

Hewitt, (1974), señaló que se requieren condiciones ambientales especiales de temperatura y humedad relativa para el desarrollo de *B. cinerea*. En un reporte reciente, Gardea-Béjar *et al.*, (2004) señalan que *B. cinerea* causa fuertes daños en vid postcosecha, pero que sus efectos rara vez se observan en los viñedos de Sonora; considerando que se requieren condiciones especiales para su infección y que el clima seco y caliente del estado es suficiente para inhibir su infección. Sin embargo, este estudio indica que las condiciones de finales de invierno en la región son suficientes para que se establezca la infección latente que bajo condiciones de postcosecha (65% HR y 20°C) permiten la reactivación del hongo.

El aislamiento de *B. cinerea* se obtuvo a partir de la esporulación del hongo sobre porciones de racimos de uva de mesa colocados en cámara húmeda, de donde se tomó micelio y conidios y se inocularon en medio de cultivo PDA a 20°C. Lo que coincide con lo hecho por Martínez-Fernández, (2003), que trabajando con la inducción de la infección de *B. cinerea* usó hojas de nochebuena con síntomas de tizón foliar y las colocó en cámara húmeda para inducir la esporulación y posteriormente desarrollar el micelio y esporas en PDA a 20°C. Los resultados obtenidos indican que para que *B. cinerea* establezca una relación parasítica con sus plantas hospedantes debe llevar a cabo el proceso de penetración, a partir de los conidios germinados y de micelio creciendo en tejidos muertos de la planta (Verhoeff, 1980).

Esto apoya lo realizado al inocular artificialmente el hongo donde para propiciar la penetración y la infección se preparó el inoculo en una solución de glucosa al 3% como lo comprobó Martínez-Fernández, (2003) en nochebuena, donde evaluando glucosa al 3% y solo agua al momento de la infección, encontró que las esporas solo germinaron en la solución. Algunos autores indican que es necesario el suministro de nutrimentos para estimular la germinación y el desarrollo del micelio sobre la superficie de la planta así como para la formación de apresorios (Clark y Lorbeer, 1976) (Figura 14).

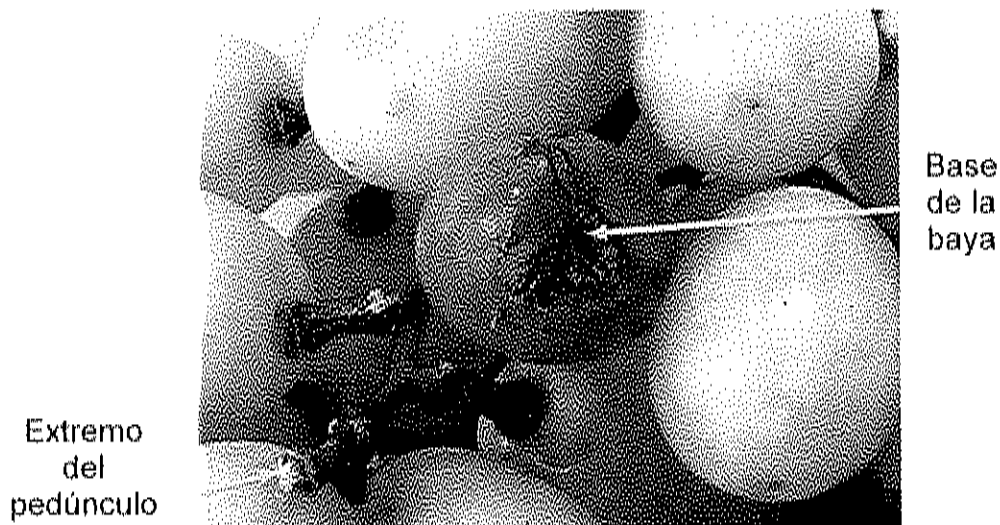


Figura 14. Porciones del racimo y baya analizadas (base de la baya y extremo del pedúnculo) de donde se aisló y permanece en latencia *B. cinerea*.

Durante la interacción de *B. cinerea* con su hospedante, en el área de contacto entre la punta del tubo germinativo de la espora y la epidermis del hospedante, una pequeña punta infectiva penetra por presión mecánica la cutícula foliar de nochebuena en un área muy pequeña (Martínez-Fernández, 2003). Tal y como se pudo comprobar en los cortes histológicos de flores de vid. McKeen, (1974), al estudiar el proceso infectivo en hojas de *Vicia fabae*, encontró que después de la penetración, las paredes epidérmicas empiezan a dividirse en dos o más capas y la cutícula se separa de la epidermis; detectando además, la actividad de esterases en la punta del tubo germinativo en el momento de la penetración y sugirió que estas enzimas degradaban la cutícula del hospedante.

CAPITULO III

**ACTIVIDAD DE QUITINASAS ASOCIADAS A UNA INFECCIÓN ARTIFICIAL CON *BOTRYTIS* Y
DETECCIÓN MOLECULAR DE UN GEN ESPECÍFICO DEL HONGO.**

RESUMEN

Con el objetivo de dar seguimiento químico y genético al proceso infectivo de *Botrytis* en vid y tratar de demostrar el desarrollo de infecciones latentes en las bayas inoculadas; una vez que se determinó la causa de la pudrición de racimos en vid para mesa, mediante la caracterización morfológica y molecular de *Botrytis* y ante la imposibilidad de reaislarlo y darle seguimiento histológico a su infección; se optó por el análisis enzimático mediante espectroscopia de fluorescencia de los extractos de las uvas inoculadas, y detectar la concentración de quitinasas inducidas por el hongo en las bayas inoculadas. Sin embargo, al no detectar actividad de quitinasas con el sustrato usado, se comprobó que en el caso de infecciones de vid con *Botrytis* no se estimula la producción de quitinasas. Para demostrar la infección latente del hongo en los tejidos infectados; las bayas inoculadas se molieron en nitrógeno líquido, se obtuvo el ADN genómico de la vid y se detectó el gen del hongo, concluyendo en forma evidente que *Botrytis* desarrolla infecciones latentes en las bayas. Como prueba confirmatoria se secuenciaron los diferentes genomas y se compararon con los de otras especies y se encontró una similitud de 100%.

ANTECEDENTES

Botrytis cinerea posee una amplia gama de hospedantes, causando diferentes daños en los tejidos que infecta; también es importante en plantas ornamentales cultivadas en invernadero. Es el principal agente causal de la pudrición de racimos de la vid, ocasionando daños considerables durante la cosecha y postcosecha; incluyendo en algunos casos, daños al follaje, brotes y racimos en desarrollo. Penetra directamente las células epidérmicas, después de la germinación de las esporas y formación de las estructuras de infección. Una vez dentro de los tejidos, crece de manera necrotrófica macerando los tejidos por acción de enzimas y toxinas producidas por las hifas (Jarvis, 1980b y Verhoeff, 1980).

Las especies de *Botrytis*, secretan enzimas pécticas y otras enzimas que degradan la pared celular, provocando la muerte de las células de la planta y las hifas del hongo, avanzan a lo largo de la lamella media. Después de la penetración, el hongo vive saprofiticamente en los tejidos senescentes de la planta, principalmente del parénquima y continúa colonizando los tejidos conforme va avanzando su lesión, la secreción de enzimas y toxinas precede al avance de las hifas. La cutícula es una barrera importante durante la penetración de *Botrytis*; por lo que cuando se ocasionan heridas que la destruyen, se favorece una infección más rápida por este hongo (Brown, 1965, Mansfield y Deverall, 1974; Stockwell y Hanchey, 1985).

Las plantas responden a la invasión de los patógenos, desplegando varios mecanismos de defensa inducidos, que detienen el avance de la enfermedad. Estas defensas involucran la producción de proteínas, denominadas proteínas relacionadas con la patogénesis (PRP), que son inducidas en las plantas por los patógenos y que están asociadas con reacciones necróticas (van Loon, 1985). Dentro de estas proteínas identificadas y caracterizadas se incluyen algunas quitinasas y 1, 3- β -glucanasas, cuya función es degradar las paredes celulares de hongos y bacterias (Punja y Zhang, 1993).

Las plantas contienen metabolitos secundarios con actividad antifúngica, entre los que se encuentran: glucosinolatos, compuestos fenólicos y fitoalexinas. Estos compuestos participan en la defensa inducida y constitutiva de la planta, su efectividad para contener la infección depende de varios factores, donde se incluyen: concentración, velocidad de inducción, contacto entre el patógeno y el químico y si el patógeno puede tolerar, detoxificar o prevenir la síntesis de estos compuestos de defensa (vanEtten *et al.*, 1989; Bennett y Wallsgrave, 1994). La fitoalexina letucenina A se acumula en las hojas de lechuga después de la infección por *B. cinerea*, cuando las hojas son inoculadas con conidios del hongo; su acumulación esta asociada con lesiones limitadas, restringiendo la extensión de la enfermedad y cuando las hojas son inoculadas con suspensiones de micelio, algunos procesos de degradación

impiden la acumulación de letucenina A y por lo tanto la infección se extiende (Bennett *et al.*, 1994).

Durante los últimos diez años, muchas investigaciones se han enfocado al estudio del papel que juegan las quitinasas (poli (1,4-(*N*-acetil- β -D-glucosaminido)) glicanohidrolasa, EC 3.2.1.14) en las plantas. Existe evidencia, de que son proteínas antifungosas que forman parte importante en respuestas a estrés no específicos y que consisten de varias clases de enzimas, producidas por muchas plantas como reacciones de defensa. Las quitinasas en organismos con quitina, participan en varias funciones, tales como morfogénesis, división celular, defensa, nutrición, y patogénesis (Sampson y Gooday, 1996 y Brurberg *et al.*, 2000). La quitina (polímero (1,4- β -*N*-acetil- β -D-glucosamina) es el segundo polímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa y es el principal componente estructural del exoesqueleto de insectos y crustáceos y de las paredes celulares de muchos hongos. La baja actividad constitutiva de las quitinasas en muchas plantas se induce dramáticamente por heridas o por infección del tejido por hongos o bacterias fitopatógenas ó por compuestos como el etileno (Graham y Sticklen, 1994).

La digestión enzimática de la quitina de los hongos, mediante quitinasas representa un método efectivo para su control. Más aún, la producción y acumulación de quitinasas en los sitios de infección mediante bacterias colonizadoras del rizoplasma ó filoplasma, tales como las *Pseudomonas* fluorescentes constituyen un método nuevo de control biológico. La adición de

quitina al suelo, disminuye no solo las poblaciones de hongos y nematodos fitopatógenos, al incrementar las poblaciones de bacterias quitinolíticas, especialmente actinomicetos y hongos, sino que también reduce su infectividad y por lo tanto los daños a los cultivos (Fuchs *et al.*, 1986).

De igual forma, las quitinasas poseen actividad contra hongos del follaje y de los frutos de las plantas, inhibiendo su infección al acumularse en los tejidos adyacentes al patógeno debido a que se promueve su síntesis mediante genes de la misma planta como una respuesta de defensa. Tal y como lo establecieron Arlorio *et al.*, 1992 y Robinson *et al.*, 1997 quienes estudiando el efecto inhibitor de las quitinasas en frijol, calabazas y vid, encontraron que algunos hongos como *Botrytis*, *Rhizoctonia* y otros hongos eran inhibidos, logrando disminuir fuertemente sus efectos en los tejidos.

Robert *et al.*, 2002 estudiando la expresión de los genes de las quitinasas en vid, con daños de *Plasmopara viticola* y *Uncinula necator* y *Botrytis cinerea* en las bayas, detectaron la presencia de quitinasas en bayas inmaduras atacadas por *Plasmopara* y *Uncinula* pero no así en las bayas con *Botrytis*, concluyendo que la expresión de los genes de quitinasas no se lleva a cabo en infecciones por *Botrytis* en las bayas.

En la detección de hongos fitopatógenos en los tejidos de las plantas se utilizan substratos fluorogénicos, como el 4-metil-umbelliferil (MUF), substrato enzimático introducido en estudios de procesos en sistemas acuáticos. Se usa también en ensayos de actividad de hongos en cultivo puro como un substrato

soluble que puede entrar en la pared celular del hongo y detectar actividad enzimática. Este sustrato sirve para detectar también actividad quitinolítica fungosa y de celulasas *in vitro*, se agrega al ambiente del hongo y cuando se hidroliza libera 4-metil-umbelliferona (4-MUF) la cuál fluoresce y puede cuantificarse en concentraciones nanomolares (Miller *et al.*, 1998).

Serratia marcescens Bizio, es una bacteria Gram negativo que secreta una variedad de enzimas extracelulares, incluyendo quitinasas; es una de las bacterias más efectivas en la degradación de quitina y cuando se le cultiva en presencia de quitina pueden detectarse enzimas quitinolíticas y proteínas unidas a quitina. *S. marcescens*, produce tres quitinasas (ChiA, ChiB, ChiC) una quitobiosa y una proteína enlazada a quitina (CBP21). La maquinaria quitinolítica de *S. marcescens* es de gran interés, debido a que es una de las mejores caracterizadas en la actualidad (Brurberg *et al.*, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de quitinasas.

Se prepararon extractos acuosos de bayas para el ensayo fluorométrico de quitinasa, usando el substrato 4-metil-umbelliferil- β -*N,N,N'*-triacetilquitotriosido [4-MU- β -(GlcNAc)₃], como ha sido descrito por Mc Creath y Gooday, (1992). La longitud de onda de excitación fue 360 nm y la de emisión fue de 450 nm, detectada a una velocidad de una medición por segundo en un Espectrofluorómetro QM-2003 (Photon Technologies Int.). Se utilizó como testigo la enzima quitinasa comercial de *Serratia marcescens* Bizio (Sigma-Laboratories) (Byrne *et al.*, 2001)

Caracterización molecular de *B. cinerea* en las bayas.

Debido a que con la microscopía de luz, no se pudo concluir categóricamente, la infección por *Botrytis* en las muestras, se utilizó la prueba de PCR. El patrón total del ADN genómico del hongo, se extrajo a partir de 100 mg de micelio y conidios por el método de Lodhi *et al.*, (1994) y la concentración del ADN se estimó por absorbancia a 260 nm. Bayas inoculadas de los cultivares Flame Seedless y Princess Seedless se pulverizaron en nitrógeno líquido para extraer el ADN genómico según lo descrito por Lodhi *et al.*, (1994). Las reacciones de PCR se realizaron con los iniciadores: 18SARN-Fw (5'-TTACAGAGTTCATGCCCGAAAG-3') y 18SARN-Rv (5'-

TTAAGTTCAGCGGGTATCCC-3'). Estos iniciadores se diseñaron tomando como base la región de ADNr contenida en el ITS1 y 2, codificando la secuencia 5.8S de ADNr y la secuencia parcial del 18S ADNr y 29S ADNr, previamente depositados en el GenBank con número de acceso AY568636. Las reacciones de amplificación se llevaron en un volumen final de 100 μ L, conteniendo: 100 ng de ADN total; 10 μ L de buffer 10X (600 mM Tris-SO₄, pH 8.9 y 180 mM de sulfato de amonio); 3 μ L de MgSO₄ (50 mM); 1 μ L de cada iniciador (100 pM/ μ L); 2 μ L de dNTP a 10 mM y 0.5 μ L de ADN polimerasa Taq *Platinum* de alta fidelidad (2.5 unidades). Las reacciones de PCR se corrieron en un Termociclador Perkin Elmer Cetus 480, bajo el siguiente programa: 3 min a 94°C seguido por 30 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 57°C, 30 seg a 72°C y una extensión final de 7 min a 72°C. Los productos de PCR se analizaron en gel de agarosa al 1% en 0.5X de Tris-Borato EDTA, teñidos con bromuro de etidio y observado bajo luz UV.

Extracción de ADN del hongo y de las bayas.

El ADN genómico del hongo, se extrajo a partir de 100 mg de micelio y conidios por el método de Lodhi *et al.*, (1994) y la concentración del ADN se estimó por absorbancia a 260 nm. Bayas maduras de los cultivares Flame Seedless y Princess Seedless se pulverizaron en nitrógeno líquido para extraer el ADN genómico según lo descrito por Lodhi *et al.*, (1994).

Amplificación de la región intergénica ITS1 e ITS2 ADNr del hongo

Para las reacciones de PCR, primero se hizo el diseño de los iniciadores: sentido 18SARN-Fw (5'-TTACAGAGTTCATGCCCGAAAG-3') y antisentido 18SARN-Rv (5'-TTAAGTTCAGCGGGTATCCC-3'). Estos iniciadores se diseñaron a partir de la secuencia de la región ITS1 ADNr e ITS2 ADNr de *Botrytis cinerea* previamente caracterizada en la presente investigación (GenBank con número de acceso AY568636). Las reacciones de amplificación se llevaron a un volumen final de 100 μ L, conteniendo: 100 ng de ADN total; 10 μ L de buffer 10X (600 mM Tris-SO₄, pH 8.9 y 180 mM de sulfato de amonio); 3 μ L de MgSO₄ (50 mM); 1 μ L de cada iniciador (100 pM/ μ L); 2 μ L de dNTP (10 mM) y 0.5 μ L de ADN polimerasa Taq *Platinum* de alta fidelidad (2.5 unidades). Las reacciones de PCR se corrieron en un Termociclador Perkin Elmer Cetus 480, bajo el siguiente programa: 3 min a 94°C seguido por 30 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 57°C, 30 seg a 72°C y una extensión final de 7 min a 72°C. Los productos de PCR se analizaron en gel de agarosa al 1% en 0.5X de Tris-Borato EDTA, teñidos con bromuro de etidio, observados bajo luz UV y fotografiados con una cámara digital Kodak.

Secuenciación de los amplicones y análisis de secuencias.

El ADN amplificado se purificó con un sistema de limpieza QIAquick[®]PCR (Qiagen) y secuenciado en el Laboratorio de Secuenciación (GATC) de la Universidad de Arizona en Tucson, Arizona, USA. Para la secuenciación se usaron los iniciadores 18SARN-Fw y 18SARN-Rv. Para el

análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas se utilizó el algoritmo BLAST y para el alineamiento de las secuencias se utilizó el programa Clustal W.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad de quitinasas

En los extractos preparados a partir de las bayas maduras inoculadas en los diferentes estados de desarrollo (prefloración, floración y postfloración) y las bayas control (sin inocular) no se detectó actividad de quitinasas mediante el ensayo con fluorescencia. Como se observa en la Figura 15, la cantidad de fluorescencia detectada durante 60 segundos no aumentó al reaccionar los extractos de las diferentes muestras experimentales con el 4-MUF. En un experimento control (datos no mostrados), la quitina de *S. marcescens* presentó un aumento de fluorescencia contra el tiempo, mostrando una gráfica lineal con pendiente positiva. Esto indica que bajo las condiciones experimentales la actividad quitinolítica de uva es sumamente baja o inexistente en el momento del muestreo post-inoculación.

En bayas de uva, una vez que la cutícula ha sido atravesada, o poco después de la germinación y crecimiento de las hifas en los tejidos dañados o senescentes, se inicia la secreción de enzimas hidrolíticas. Específicamente, dichas enzimas degradan las paredes celulares de las células hospedantes, por lo que se considera a la pared celular como una segunda barrera ya que en las infecciones latentes se detiene el desarrollo de la infección de *B. cinerea* (Mansfield y Hutson, 1980). Esto se observó en las preparaciones histológicas de los racimos, donde se presume que *B. cinerea* está en forma latente en el

tejido infectado, ya que se detectó la presencia de polifenoles en las áreas cercanas a los sitios de infección; aunque no se pudo observar el micelio en desarrollo. Sin embargo, no se detectó la inducción de quitinasa como una reacción de defensa contra la infección del hongo. Este resultado, es concordante con lo reportado por Robert *et al.*, (2002) quienes señalan que *Botrytis* no induce la expresión del gen que sintetizará el ARNm de quitinasa *in vivo*. Por lo tanto, en ausencia del mensajero, no se anticipa encontrar a la proteína quitinasa y así mismo a la actividad enzimática bajo esas condiciones.

Ensayos Actividad Quitinasa pH 5

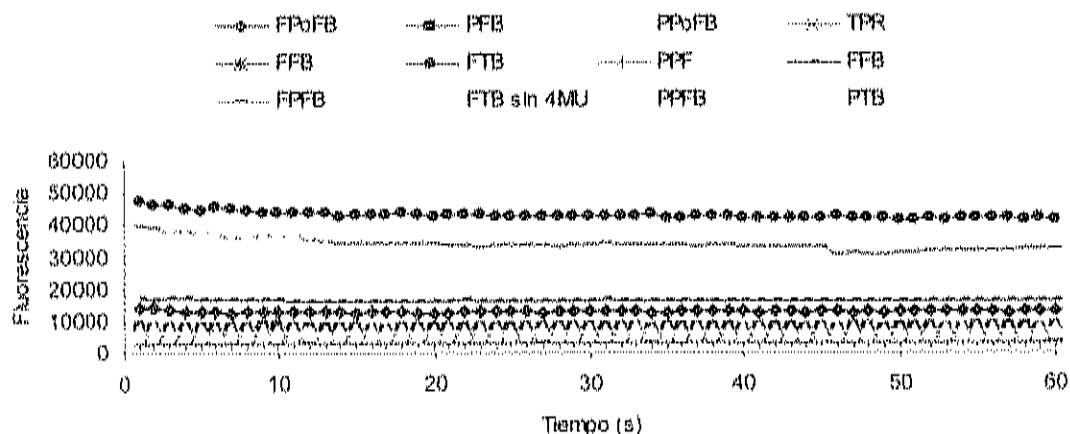


Figura 15. Grafica de Actividad Enzimática de Quitinasas determinada por el ensayo fluorométrico, tratamientos: PoFB, Postfloración Flame; PFB, Prefloración Flame; PoFPB, Postfloración Princess; TPR, Testigo Princess; FFB, Floración Flame; FTB, Testigo Flame; PPF, Prefloración Princess; FFB, Floración Flame; FPFB, Floración Princess; FTB, Testigo Flame sin 4MU; PPFB, Prefloración Princess y PTB, Testigo Princess.

La región intergénica ITS1 e ITS2 ADNr de *Botrytis cinerea* fue amplificada a partir de ADN genómico obtenido de las bayas

El ADN genómico obtenido a partir de las bayas tuvo un peso molecular característico, el cual se utilizó como molde para las reacciones de PCR. Los productos de PCR obtenidos fueron del tamaño esperado correspondiente al tamaño de la región intergénica ITS1 e ITS2 ADNr identificado para *B. cinerea* en esta investigación, siendo de 592 pb aproximadamente (Figura 16). Para

determinar la identidad de los amplicones, ambas cadenas de los productos de PCR fueron secuenciadas y comparadas contra las secuencias nucleotídicas del banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Cuando se alinearon las secuencias nucleotídicas de las diferentes muestras experimentales con la secuencia correspondiente al de *B. cinerea* (AY568636) (Figura 17) se obtuvo un 100% de identidad entre todas ellas. Lo cual confirma que el gen amplificado a partir del ADN genómico de la planta corresponde al gen específico de *B. cinerea*, evidenciando la latencia del hongo en las bayas (Figura 16).

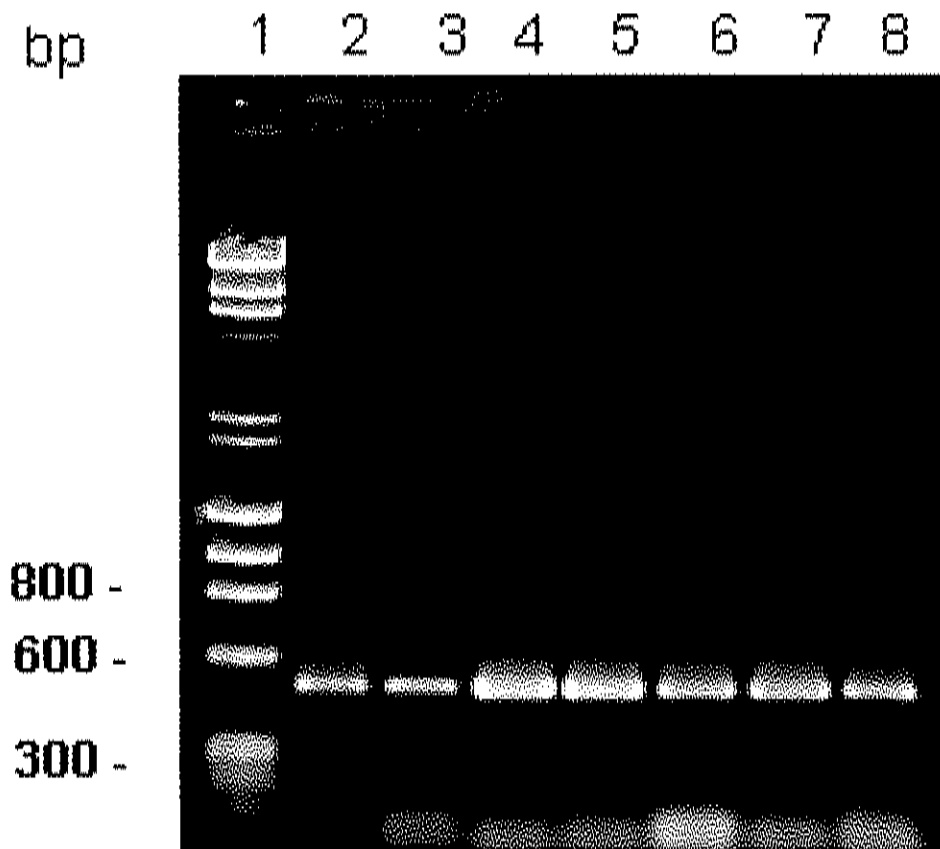


Figura 16. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos con los iniciadores específicos para la región intergénica de *B. cinerea* con los que se demuestra la infección latente en las bayas colectadas después de la inoculación con *B. cinerea*. Carril 1. Marcadores de peso molecular, 2. ADN genómico de *B. cinerea* (~500 pares de bases pb), 3. Prefloración de Princess Seedless, 4. Floración de Princess Seedless, 5. Postfloración de Princess Seedless, 6. Prefloración de Flame Seedless, 7. Floración de Flame Seedless y 8. Postfloración de Flame Seedless.


```

AY568636 (B. c.) TTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG
PEP TTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG
FP TTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG
PoFF TTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG
PEP TTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG
FP TTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG
PoFF TTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG
*****

AY568636 (B. c.) TTCTGGCATCGATGAAGAACCGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATCAG
PEP TTCTGGCATCGATGAAGAACCGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATCAG
FP TTCTGGCATCGATGAAGAACCGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATCAG
PoFF TTCTGGCATCGATGAAGAACCGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATCAG
PEP TTCTGGCATCGATGAAGAACCGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATCAG
FP TTCTGGCATCGATGAAGAACCGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATCAG
PoFF TTCTGGCATCGATGAAGAACCGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATCAG
*****

AY568636 (B. c.) TGAATCATCGAATCTTTGAACCGCACATTCGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCCTGT
PEP TGAATCATCGAATCTTTGAACCGCACATTCGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCCTGT
FP TGAATCATCGAATCTTTGAACCGCACATTCGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCCTGT
PoFF TGAATCATCGAATCTTTGAACCGCACATTCGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCCTGT
PEP TGAATCATCGAATCTTTGAACCGCACATTCGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCCTGT
FP TGAATCATCGAATCTTTGAACCGCACATTCGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCCTGT
PoFF TGAATCATCGAATCTTTGAACCGCACATTCGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCCTGT
*****

AY568636 (B. c.) TCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAG
PEP TCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAG
FP TCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAG
PoFF TCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAG
PEP TCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAG
FP TCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAG
PoFF TCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAG
*****

AY568636 (B. c.) GCTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGCTGGGTCCCTGAACCGTAGTAATAATCTCTCGTTACAGG
PEP GCTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGCTGGGTCCCTGAACCGTAGTAATAATCTCTCGTTACAGG
FP GCTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGCTGGGTCCCTGAACCGTAGTAATAATCTCTCGTTACAGG
PoFF GCTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGCTGGGTCCCTGAACCGTAGTAATAATCTCTCGTTACAGG
PEP GCTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGCTGGGTCCCTGAACCGTAGTAATAATCTCTCGTTACAGG
FP GCTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGCTGGGTCCCTGAACCGTAGTAATAATCTCTCGTTACAGG
PoFF GCTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGCTGGGTCCCTGAACCGTAGTAATAATCTCTCGTTACAGG
*****

```

Figura 17. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los amplicones obtenidos del ADN genómico de las bayas maduras 18SARNFw y 18SARNRv.

CONCLUSIONES

La enfermedad se detectó en los racimos empacados, bajo almacenamiento a 20°C y 60-65% de HR, a partir de los siete días después de colectados.

El hongo causante, se aisló de las porciones del racimo correspondientes al pedúnculo, el receptáculo de la flor y base de la baya.

Las condiciones de aislamiento en medio de cultivo PDA y 20°C resultaron adecuadas para el crecimiento de la especie presente.

La especie causante se caracterizó morfológica y molecularmente, como *Botrytis cinerea* Pers.

No se obtuvo actividad de quitinasas en las bayas, con el substrato y la concentración utilizada.

La prueba de PCR resultó efectiva para la caracterización y secuenciación de *Botrytis*. Así mismo se pudo comprobar el desarrollo de infecciones latentes en las bayas, lo cuál no fue posible con microscopía de luz.

LITERATURA CITADA

Ahrens, U. and Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.

Anonymous, 2001. Lasergene. Expert sequence analysis software. User's manual. Version 5. DNASTAR, Inc. Madison, Wisconsin, USA.

Arlorio, M., Ludwig, A. Boller, T. and Bonfante, P. 1992. Inhibition of Fungal Growth by Plant Chitinases and β -1,3 glucanases. A Morphological Study. *Protoplasma* 171: 34-43.

Asociación Agrícola Local de Productores de Uva de Mesa. 2003. Exportación de Uva de Mesa. AALPUM. Hermosillo, Sonora. México.

Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th ed. APS Press. St. Paul, MN. USA. 218 pp.

- Bennett, M. H., Gallagher, M. D. S., Bestwick, C. S., Rossiter, J. T. and Mansfield, J. W. 1994. The Phytoalexin Response of Lettuce to Challenge to *Botrytis cinerea*, *Bremia lactucae* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44: 321-333.
- Bennett, R. and Wallsgrove, R. 1994. Secondary metabolites in Plant defense Mechanisms. *New Phytologist* 127: 617-633.
- Brown, W. 1965. toxins and Cell-Wall dissolving Enzymes in Relation to Plant Disease. *Annual Review of Phytopathology* 3:1-18.
- Brurberg, M. B., Synstad, B., Klemsdal, S. S., van Aalten, D. M. F., Sundheim, L. and Eljstink, V. G. H. 2000. Chitinases from *Serratia marcescens*. *Recent Research Development in Microbiology* 14: 1-18.
- Byrne, N. D., Duxbury, M. and Sharpe, N. 2001. The Determination of Chitinase Activity of Grapes: An Introductory Enzyme Assay. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 29-: 144-146.
- CAB International. 2001. *Descriptions of Fungi and Bacteria* CAB International. Wallingford, UK.

- Clark, C. A. and Lorbeer, J. W. 1976. Comparative Histopathology of *Botrytis squamosa* and *B. cinerea* on Onions Leaves. *Phytopathology* 66 (12):1279-1289.
- Coertze, S. and Holz, G. 2002. Epidemiology of *Botrytis cinerea* on Grape: Wound Infection by Dry Airborne Conidia. *South African Journal of Enology and Viticulture* 23 (2):72-77.
- Coombe, B. G. 1987. Distribution of Solutes within the Developing Grape Berry in Relation of its Morphology. *American Journal of Enology and Viticulture*. 38:120-127.
- Dokoozlian, N., Luvisi, D., and Ebisuda, N. 1999. Berry Cracking in Table Grapes. *Grape Grower Magazine* 5: 16, 41-43.
- Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. 1985. *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press. Boca Raton, Fla. USA. 355 pp.
- Flaherty, D. L., Jensen, F. H., Kasimatis, A. N., Kido, H. and Moller, W. J. 1981. *Grape Pest Management*. Division of Agricultural Sciences. University of California. Berkeley, California. USA. p.51-56.

Fuchs, R. L., McPherson, S. A. and Drahos D. J. 1986. Cloning of a *Serratia marcescens* Gene Encoding Chitinase. *Applied and Environmental Microbiology* 51(3): 504-509.

Gardea-Béjar, A. A., Martínez-Téllez, M. A., Sánchez, A., Báez-Sañudo, M., Siller, J. H., González-Aguilar, G. A., Báez-Sañudo, R., Crisosto, C .H. y Criddle, R. S. 1994. Post-harvest Weight Lost of Flame Seedless Clusters. *In*: Rantz, J. M. (Ed.). *International Symposium on Table Grape Production*. Anaheim, Cal., USA. Junio 28 y 29. p. 203-206.

Gardea-Béjar, A. A., Carvallo, T., Sastré, B., Martínez-Téllez, M. A., Yépiz-Plascencia, G. M., Díaz-Cinco, M. and Orozco, J. A. 2004. Table Grape Postharvest Management and Safety Issues. *In*: Dris, R. and Jain, S. M. (eds.). *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops*. Vol. 3. *Quality Handling and Evaluation*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p. 307-320.

Graham, L. S. and Sticklen, M. B. 1994. Plant Chitinases. *Canadian Journal of Botany* 72: 1057-1083.

Hewitt, W. B. 1974. Rots and Bunch Rots of Grapes. Bulletin No. 868. Division of Agricultural Sciences. University of California. 51 pp.

Holz, G., Coertze, S., and Basson, E. J. 1997. Latent Infection of *Botrytis cinerea* in Grape Pedicels Leads to Postharvest Decay. (Abstr.) *Phytopathology* 87 (suppl.):S43.

Holz, G., Gütchow, M., Coertze, S. and Calitz, F. J. 2003. Occurrence of *Botrytis cinerea* and Subsequent Disease Expression at Different Positions on Leaves and Bunches of Grape. *Plant Disease* 87(4):351-358.

Jarvis, W. R. 1980a. Taxonomy. *In*: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W.R. (eds.). *The Biology of Botrytis*. Academic Press. New York, USA. p. 1-18.

Jarvis, W. R. 1980b. Epidemiology. *In*: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W.R. (eds.). *The Biology of Botrytis*. Academic Press. New York, USA. p.219-245.

Jiménez-León, M. 1984. Guía para la Asistencia Técnica Agrícola. Área de influencia del Campo Agrícola Experimental. Costa de Hermosillo. SARH. CIANO. CAECH. Hermosillo, Sonora. México. 83 pp.

Keller, M., Viret, O. and Cole, F. M. 2003. *Botrytis cinerea* Infection in Grape Flowers: Defense Reaction, Latency, and Disease Expression. *Phytopathology* 93(3):316-322.

Kennedy, J. 2002. Understanding Grape Berry Development. Practical Winery and Vineyard. July-August. Oregon State University. Corvallis, Or. USA. p.1-8.

Korf, I., Yandell, M. and Bedell, J. 2003. Blast. An Essential Guide to the Basic Local Alignment Search Tool. O'Reilly & Associates, Inc. Sebastopol, CA. USA.

Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F. and Reisch, B. I. 1994. A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and *Vitis* Species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12: 6–13.

Márquez-Cervantes, J. A. 2000. Curso de Viticultura. SAGARPA-INIFAP. México.

- Martínez-Fernández, E. 2003. Patogénesis Inducida por *Botrytis cinerea* Pers. En dos Cultivares de Nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzch). Tesis Doctoral. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 91 pp.
- Mansfield, J. W. and B. J. Deverall. 1974. The Rates of Fungal Development and Lesion Formation in Leaves of *Vicia fabae* During Infection by *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. *Annals of Applied biology* 76: 77-89.
- Mansfield, J. W. and Hutson, R. A. 1980. Microscopical Studies on Fungal Development and Hosts Responses in Broad Bean and Tulip Leaves Inoculated with Five Species of *Botrytis*. *Physiological Plant Pathology* 17:131-144.
- McClellan, W. D. and Hewitt, W. B. 1973a. Early *Botrytis* Rot of Grapes. Time of Infection and Latency of *Botrytis cinerea* Pers. in *Vitis vinifera* L. *Phytopathology* 63(9):1151-1157.
- McClellan, W. D., Hewitt, W. B., LA Vine, P. and Kissler, J. 1973b. Early *Botrytis* Rot of Grapes and its Control. *American Journal of Enology and Viticulture* 24 (1):27-30.

McCreath, E. and Gooday, G. W. 1992. A Rapid and Sensitive Microassay for Determination of chitinolytic activity. *Journal of Microbiological Methods* 14:229-37.

McKeen, W. E. 1974. Mode of Penetration of Epidermal Cell Walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 64 (4):461-467.

Miller, M., Palojarvi, A., Raanger, A., Reeslev, M. and Kjoller, A. 1998. The Use of Fluorogenic Substrates to Measure Fungal Presence and Activity in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 613-617.

Miranda, O. 2003. Uva de Mesa. Estudio 1. EG.33.7. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura-Argentina. Ministerio de Economía de la Nación. Buenos Aires, Argentina. p. 1- 48.

Nelson, K. E. 1985. Harvesting and Handling California Table Grapes for Market. 2nd Ed. ANR Publications. University of California. Oakland, Ca. USA. p. 1-10.

- Nelson, K. E. 1991. The Grape. *In*: Skin, N. A. M. (Ed.). Quality and Preservation of Fruits. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. p. 165-167.
- Peacock, B. and J. Smilanick. 1996. Postharvest Decay of Late Season Table Grapes. University of California. Tulare, CA, USA. Pub. IPM3-96. 4 pp.
- Pearson, R. C., and Goheen, A. C. 1988. Compendium of Grape Diseases. American Phytopathological Society. St. Paul, MN, USA. p.1-10.
- Pijpers, D., Constant, J. G., and Jansen. K. 1986. The Complete Book of Fruit. Gallery Books. New York, NY, USA. p.150-160.
- Pratt, C. 1971. Vegetative Anatomy of Cultivated Grapes – A Review. *American Journal of Enology and Viticulture* 22: 92-109.
- Punja, Z. K. and Zhang, Y. Y. 1993. Plant Chitinases and their Roles in Resistance to Fungal diseases. *Journal of Nematology* 25: 526-540.

Robert, N., Roche, K., Lebeau, Y., Breda, C., Boulay, M., Esnault, R. and Buffard, D. 2002. Expression of Grapevine Chitinase Genes in Berries and Leaves Infected by Fungal or Bacterial Pathogens. *Plant Sciences* 162:389-400.

Robinson, S. P., Jacobs, A. K. and Dry, I. B. 1997. A Class IV Chitinase is Highly Expressed in Grape Berries during Ripening. *Plant Physiology* 114: 771-778.

Sampson, M. N. and Gooday, G. W. 1998. Involvement of Chitinases of *Bacillus thuringiensis* during Pathogenesis in Insects. *Microbiology* 144: 2189-2194.

Stockwell, V. and Hanchey, P. 1985. Effect of Cuticle Treatments on Infection of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 114: 6-12.

Vail, M. E., and Marois, J. J. 1991. Grape Cluster Architecture and the Susceptibility of Berries to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 81: 188-191.

Valenzuela-Cornejo, P. 1986. Evaluación de Fungicidas en Diferentes Épocas de Aplicación sobre el Desarrollo de la Pudrición de Racimos en Vid e Identificación de Organismos Asociados. Tesis de Licenciatura. Escuela de Agricultura y Ganadería. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. México. 51 pp.

VanEtten, H. D., Mathews, D E. and Mathews, P. S. 1989. Phytoalexins Detoxification: Importance for Pathogenicity and Practical Implications. Annual review of Phytopathology 27: 143-167.

Van Loon, L. 1985. Pathogenesis-Related Proteins. Plant Molecular Biology 4: 111-116.

Verhoeff, K. 1980. The Infection Process and Host-Pathogen Interactions. *In*: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W.R. (eds.). The Biology of *Botrytis*. Academic Press. New York, USA. p. 153-180.

Viret, O., Keller, M., Jaudzems, V. G. and Cole, F. M. 2004. *Botrytis cinerea* Infection of Grape Flowers: Light and Electron Microscopical Studies of Infection Sites. Phytopathology 94: 850-857.

Waller, J. M., Lenné, J. M. and Waller, S. J. 2002. Plant Pathologist's Pocketbook. 3rd Ed. CAB Internacional, New York, USA. 516 pp.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *In*: Innis, M. A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.). PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. Academic Press, St. Diego, CA. USA. p 315-322.

Zitter, M. S. and Wilcox, F. W. 2004. *Botrytis* Bunch Rot: Effects of Infection Timing, Cluster Architecture, and Berry N Content. American Society of Enology and Viticulture 55th Annual Meeting Abstract. 30 June - 2 July. San Diego, Cal., USA. American Journal of Enology and Viticulture 55 (3): 306A.

Waller, J. M., Lenné, J. M. and Waller, S. J. 2002. Plant Pathologist's Pocketbook. 3rd Ed. CAB Internacional. New York, USA. 516 pp.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *In*: Innis, M. A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.). PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. Academic Press, St. Diego, CA. USA. p 315-322.

Zitter, M. S. and Wilcox, F. W. 2004. *Botrytis* Bunch Rot: Effects of Infection Timing, Cluster Architecture, and Berry N Content. American Society of Enology and Viticulture 55th Annual Meeting Abstract. 30 June - 2 July. San Diego, Cal., USA. American Journal of Enology and Viticulture 55 (3): 306A.