

(S2-P163)

PUDRICIÓN DE RACIMOS DE UVA DE MESA (*Vitis vinifera* L.) EN POSTCOSECHA: UNA AMENAZA LATENTE EN SONORA

FRANCISCO RIVAS-SANTOYO⁽¹⁾, EMILIO JIMÉNEZ-GARCÍA⁽²⁾, ROGERIO SOTELO-MUNDO⁽³⁾, MARÍA A. ISLAS-OSUNA⁽³⁾ y REGINALDO BÁEZ-SAÑUDO⁽³⁾

⁽¹⁾Departamento de Agricultura y Ganadería. Universidad de Sonora, Km. 21 Carretera a Bahía de Kino, Código Postal 83000. Hermosillo, Sonora. México. frivas@hmo.megared.net.mx. Tel. y Fax (662) 2-13-80-06.

⁽²⁾INIFAP Sonora, Blvd. del Bosque #7, Código Postal 83000. Hermosillo Sonora. México. jimenez.emilio@inifap.gob.mx. Tel. y Fax (662) 2-16-46-19.

⁽³⁾Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Km. 0.6 Carretera a La Victoria, Código Postal 83000. Hermosillo, Sonora. México. rebasa@hmo.megared.net.mx. Tel. (662) 2-89-24-00.

Palabras Clave: biotecnología - *Botrytis cinerea* – PCR

RESUMEN

La identificación del agente causal de la pudrición de racimos de la vid en uva para mesa en Sonora, ha permanecido sin determinar por muchos 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 para mesa durante la cosecha y empaque, en viñedos de Hermosillo, Sonora. De los tejidos analizados se aisló un hongo, el cual se caracterizó morfológica y molecularmente mediante la prueba de PCR, que se identificó como *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. 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 infeccioso 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 determinó la actividad de la enzima quitinasa durante el proceso de infección, encontrándose que dicha enzima no se induce por la presencia de *Botrytis* en la baya. También se comprobó la infección latente de *Botrytis* en bayas de ambos cultivares, mediante la prueba de PCR: Se discuten los resultados y las implicaciones para el manejo de *Botrytis* durante la postcosecha en uva de mesa.

POSTHARVEST BUNCH ROT DISEASE IN TABLE GRAPES (*Vitis vinifera* L.). A LATENT THREAT IN SONORA.

Keywords: Biotechnology-*Botrytis cinerea*-PCR-Sonoran Desert.

ABSTRACT

Identification of the causal agent of bunch rot disease in table grapes at the Sonoran Desert remained elusive for many years. To establish the nature of the pathogen, samples of grape clusters were taken during harvest and packing processes in vineyards from Hermosillo,

Sonora, Mexico. A fungus was isolated, which was morphologically and molecularly characterized as *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. To confirm the etiology of the bunch rot, artificial inoculations of *B. cinerea* were done in Flame Seedless and Princess Seedless cultivars during pre-bloom, full bloom and post-bloom stages. Cluster samples were taken and fixed at different time intervals for histological analysis. Spore germination and germ tube elongation occurred 48 and 72 h after inoculation (HAI) and the infection happened 96 HAI along the berry basal portion. Likewise, *Botrytis* infection occurs in spite of the dry and hot weather of Sonoran desert. Latent infection of *Botrytis* was verified in berries of both cultivars. This report shows the latency of *B. cinerea* during high-temperature weather and its availability for infection under milder conditions during post-harvest storage.

INTRODUCCIÓN

La producción de uva de mesa en Sonora, principalmente en Hermosillo y Caborca, es una actividad importante en la generación de empleos e ingreso de divisas. Se obtiene una producción anual aproximada, de veinte millones de cajas de uva de mesa para exportación hacia Estados Unidos, Canadá y Europa; de esta producción, un bajo porcentaje se dedica al mercado nacional (AALPUM, 2006). La pudrición de racimos de la vid (*Vitis vinifera* L.), presente en regiones de climas húmedos y fríos del mundo e inducida por el hongo *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., causa fuertes pérdidas en racimos en formación y durante postcosecha (Flaherty *et al.*, 1981). Es la principal enfermedad de las uvas, tanto en el viñedo, como durante la cosecha y postcosecha (McClellan *et al.*, 1973a).

En Sonora, la pudrición de racimos de uva de mesa se presenta al momento de la cosecha y almacenamiento a bajas temperaturas, antes y durante su transporte al mercado final. Sin embargo, debido a las temperaturas elevadas que ocurren en Sonora, bajo las cuales se cultiva la vid en las diferentes regiones del estado, se ha descartado *a priori* a *B. cinerea* como el agente causal; reportándose otros hongos, aislados de bayas (*Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Alternaria sp.* y *Rhizopus sp.*) (Gardea-Bejar *et al.*, (2004). Otro factor importante a considerar, por el que se descarta su presencia, es que la producción de vid de Sonora se destinaba principalmente a la vitivinicultura, de forma tal que durante su cosecha, en los meses de julio y agosto, no se presentaban las condiciones de temperatura favorables para el desarrollo de la enfermedad. En California, USA, McClellan y Hewitt (1973), denominaron el problema como pudrición temprana de la vid por *Botrytis* y establecieron que el hongo se desarrolla en forma latente en las bayas, infectando durante la floración, en espera de la acumulación de azúcares y que cuando los racimos maduran, se cosechan y se enfrían para su mercadeo, el hongo termina su latencia favoreciendo la pudrición de racimos. Holz *et al.*, (2003) y Coertze y Holz (2002), reportaron en Sud África, la presencia de *Botrytis* en los racimos, asociándolo con la base de las bayas y estableciendo que las bayas son resistentes cuando están inmaduras y susceptibles cuando maduran. Keller *et al.*, (2003) y Viret *et al.*, (2004), establecieron la importancia de la infección durante la floración y el desarrollo de latencia en tanto las bayas llegan a la madurez; desconociendo, la dirección que sigue la infección y el sitio donde el hongo permanece en latencia en las bayas jóvenes.

En base a lo anterior, los objetivos del presente trabajo fueron: a) establecer la causa de la pudrición de racimos de la vid y la importancia de *Botrytis* como causante de la pudrición de racimos de uva de mesa bajo las condiciones de cultivo en Sonora, b) caracterizar la especie del hongo morfológica y molecularmente, c) determinar el proceso infectivo del hongo en los racimos mediante inoculaciones artificiales, cortes histológicos y seguimiento enzimático y d) confirmar su latencia mediante PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

Aislamiento. Porciones de racimo intactas, raquis, pedicelos y bayas previamente desinfectados mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 5% (NaOCl) por 3 min, se colocaron en cámara húmeda (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 esta, se tomo una porción de micelio y esporas y se inocularon en cajas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) (Difco Laboratorios), 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 inocularon 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 y caracterizar las diferentes cepas.

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

Caracterización molecular. A partir de aislamientos monoconidiales de *Botrytis 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) mediante la proporción: A_{260}/A_{280} . 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 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) Y ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White, *et al.*, 1990). Las reacciones de PCR con un volumen final de 25 μ L contenían: 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 1 min, 50°C por 30 seg y 72°C por 2 min 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. Se purificó con un paquete QIAquick[®] PCR de acuerdo con las especificaciones de la compañía. Los productos de PCR 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 se contrastaron con una base de datos de GenBank del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) según Korf *et al.*, (2003). Se consideraron solo los valores cuantitativos más altos generados por el programa. Las primeras secuencias alineadas, 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. Para asegurar la identidad del hongo mediante técnicas moleculares, se amplificó un fragmento de ADN proveniente del ADN genómico del hongo, el cuál esta incluido en la secuencia parcial del gene ARN ribosomal 18S; la secuencia completa para el

espaciador de transcripción interno 1 (ITS1), del gene ARN ribosomal 5.8S, y el ITS2, de la secuencia completa; y la secuencia parcial para el gene ARN ribosomal 28S.

Inoculaciones artificiales *in vivo*. Con el propósito de corroborar la patogenicidad del hongo aislado, a inicios de la estación de crecimiento del cultivo, 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 y se marcaron los racimos 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 mediante un hematocítometro. 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 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; los cortes (de 8 μ m) se tiñeron con la coloración diferencial de safranina-verde rápido y la del 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 and Sinclair, 1985).

Caracterización molecular de *B. cinerea* en las bayas Debido a que con la microscopía de luz, no se obtuvo evidencia de 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 A_{260} . Bayas inoculadas congeladas 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 ADN_r contenida en el ITS1 y 2, codificando la secuencia 5.8S de ADN_r y la secuencia parcial del 18S ADN_r y 29S ADN_r, previamente depositados por la Dra. Yáñez-Morales en el 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 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.

Análisis de la secuencia de ADN. El ADN amplificado, se purificó con un sistema de limpieza QIAquick[®]PCR (Qiagen) y secuenciado en el Laboratorio de Análisis Genético y

Tecnología Nuclear (GATC) de la Universidad de Arizona en Tucson, Arizona, USA. Para la secuencia se usaron los iniciadores 18SARN-Fw y 18SARN.Rv.

Actividad de quitinasa. Se prepararon extractos acuosos de bayas como sustratos para el ensayo fluorométrico de quitinasa, usando el sustrato 4-metil-lumbeliferil- β -D-N, N'-triacetilquitotriosido [4-MU- β -D-(GlcNAc)₃] tal, 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* (Sigma Laboratorios).

RESULTADOS

El aislamiento del hongo en postcosecha, a partir de racimos de uva para mesa, de viñedos de Hermosillo; fue la primera evidencia de la importancia potencial de la enfermedad en la región. La caracterización morfológica y molecular del hongo, permitió confirmar la hipótesis de que *Botrytis* es el causante de la pudrición de racimos en uva para mesa en los viñedos; y debido a que el hongo se aisló de racimos empacados y almacenados a 20°C, se demostró también, que el hongo permanece latente en el pedicelo y en la base de la baya después de la infección en floración, en espera de mal manejo postcosecha para causar su daño.

Muestreo. En los racimos analizados, se encontró que únicamente en aquellos que habían sido previamente empacados y almacenados a 20°C, para su traslado al mercado, mostraron desarrollo de infección por el hongo, lo que indica aparentemente, que el hongo 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 pedicelo y base de las bayas de los racimos de los cultivares Flame Seedless y Princess Seedless (Fig. 1 A, B y C), 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 el más apropiado (Fig. 1 D). Los cultivos monospóricos, no produjeron cepas diferentes del hongo que estuvieran causando la pudrición de los racimos en la región. 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.

Caracterización morfológica. Las claves aplicadas para el hongo aislado correspondieron a la especie *Botrytis cinerea*, con conidióforos rectos de longitud indeterminada ramificados alternativamente con ramificaciones cortas de 10-30 μ m de longitud y ápices esféricos gruesos de 8-10 μ m de diámetro sobre los cuales se forman pequeños denticulos donde se originan conidios hialinos, lisos, unicelulares, individuales (cenizos y en masa son grises) de forma oval ó elíptica de 10-12 μ m de longitud por 8-10 μ m de ancho acomodados en un racimo irregular. Esclerocios negros de forma irregular de 2-4 por 1-3 mm.

Caracterización molecular. El ADN tuvo un peso molecular de 12.2 Kb y la banda del producto de PCR fue de 600 pb. La porción de nucleótido, total secuenciada fue de 492 pb. Las dos direcciones secuenciadas, tuvieron una similitud de 100 y correspondieron a una secuencia completa de ambas regiones de ITS. La secuencia se alineó con *B. cinerea* con número de acceso Z73765; esto fue con un 100% de similitud, el valor de alineación 954 y 0.0% de probabilidad de que fueran de alineación diferente. Finalmente, la secuencia se depositó en el NCBI con número de acceso AY568636.

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 aislar y reinocular al hongo, se aplicó la prueba de PCR, a extractos de bayas inoculadas, detectándose efectivamente la presencia del hongo (Fig. 2).

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 (Fig. 2 A, B, C y D). 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 (Fig 3. A, B y C); lo que 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 (Fig 3. D). 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, donde se detectó la acumulación de gránulos de color rojo y estos ocuparon completamente el citoplasma.

Se usaron métodos moleculares durante las etapas de cosecha y postcosecha en uvas inoculadas, debido a que no se detectó evidencia histopatológica de la infección. Se aplicó la prueba de PCR al ADN total de bayas inoculadas y se analizaron mediante electroforesis en agarosa. Se usó el ADN de *Botrytis* y de las muestras de las etapas de floración, pre y post floración de los cultivares Flame Seedless y Princess Seedless para la prueba de PCR, resultando positiva la amplificación de la región intergénica (Fig. 4).

Actividad de quitinasa. No se encontró actividad de la enzima quitinasa, en los extractos de uvas inoculadas, aplicando el ensayo de fluorescencia.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio, demostraron que el hongo *Botrytis cinerea* es el causante de la pudrición de racimos en vid para 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 se presentan en la región las lluvias de invierno y frentes fríos. Estas condiciones coinciden con lo reportado por McClellan y Hewitt (1973b), en California, U. S. A., quienes mediante una investigación denominaron a la enfermedad como pudrición temprana de los racimos por *Botrytis*; monitoreando la infección en diferentes etapas de desarrollo del racimo, determinaron que permanece latente en los tejidos de la flor para posteriormente causar la pudrición de los racimos en postcosecha.

Hewitt, (1974), en California, USA., señaló que se requieren condiciones ambientales especiales de temperatura y humedad relativa para el desarrollo de *B. cinerea*. En reporte reciente, Gardea-Bejar *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, 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) reactivarán al 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. Cuando la penetración es directa en los tejidos sanos del hospedante, es importante saber si este tipo de penetración involucra procesos químicos o mecánicos (Verhoeff, 1980).

Esto apoya lo realizado al inocular artificialmente el hongo donde para propiciar la penetración y la infección se preparó el inóculo 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 nutrientes 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). 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 infeccioso 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. 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 que 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 la 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 ARNm de quitinasa en vid. Este estudio permitirá se continúe el estudio de las relaciones planta-patógeno.

AGRADECIMIENTOS

Francisco J. Rivas-Santoyo recibió una beca doctoral de CONACYT, y agradece el apoyo suplementario de la Universidad de Sonora, CIAD, A. C., y del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados para la realización de esta investigación. R. Sotelo-Mundo agradece al proyecto 36928-B por apoyo a infraestructura y M. Islas-Osuna al proyecto 40466-Z, ambos otorgados por CONACYT. Así mismo, M. J. Yáñez-Morales hace patente su agradecimiento por el apoyo al proyecto CONACYT 38409-V. Se agradece el apoyo técnico a los M.C. Jesús Manuel García-Robles y M.C. Edgar Felipe Morán-Palacio y M.C. Nidia Caceres-Carrizosa.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Asociación Agrícola Local De Productores De Uva De Mesa. 2006. 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.
- 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.
- 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.
- Gardea-Béjar, A. A., Carvallo, T., Sastré, B., Martínez-Téllez, M. A., Yépez-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.
- Hewitt, W. B. 1974. Rots And Bunch Rots Of Grapes. Bulletin No. 868. Division Of Agricultural Sciences. University Of California. 51 P.
- Holz, G., Gûtschow, 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. 1980. 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.
- 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.
- 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.
- Martínez-Fernández, E. 2003. Patogénesis Inducida Por *Botrytis Cinerea* Pers. En Dos Cultivares De Nochebuena (*Euphorbia Pulcherrima* Willd. Ex Klotzch). *Revista Mexicana De Fitopatología* (En Imprenta).
- 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 Dentermination Of Chinolytic Activity Of Chitinolytic Activity Journal Of Microbiological Methods 12:229-37.
- Mckeen, W. E. 1974. Mode Of Penetration Of Epidermal Cell Walls Of *Vicia Faba* By *Botrytis Cinerea*. Phytopathology 64 (4):461-467.
- 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.
- 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.
- 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.

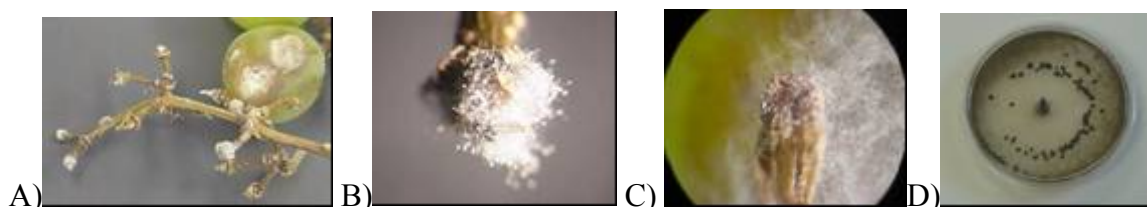
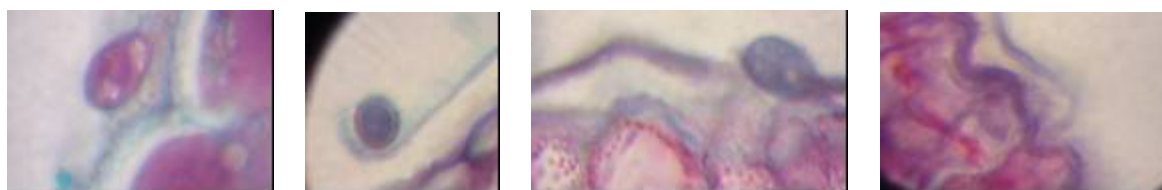


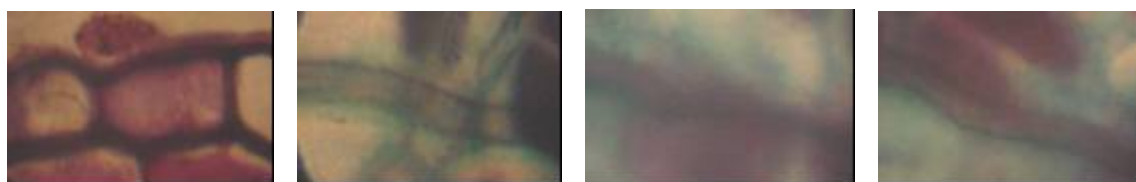
Fig. 1. Crecimiento micelial y esporas sobre pedicelos y base de las bayas del hongo asociado con la pudrición de los racimos muestreados, desarrollados en cámara húmeda después de 24 h de incubación a 20°C A), B) y C). Aislamiento en medio de cultivo PDA con crecimiento de micelio, esporas y esclerocios después de 7 días a 20°C, D).



A) B) C) D)
Fig. 2. Fotomicrografías al microscopio de luz de cortes longitudinales de flores de vid, con esporas de *Botrytis* después de la inoculación, antes de la germinación A) y B). Porción del receptáculo floral con residuos de tejido dejado por la caliptra sitio donde se llevó a cabo la penetración del hongo C) y D).



A) B) C) D)
Fig. 3. Fotomicrografías al microscopio de luz de la porción basal de las bayas con espora de *Botrytis* antes de su germinación A), germinación y desarrollo del tubo germinativo B), elongación del tubo germinativo paralelamente a la epidermis C) y penetración del tejido D).



A) B) C) D)
Fig. 4. Fotomicrografías al microscopio de luz donde se muestra la germinación de la espora de *Botrytis* sobre el tejido A), penetración y crecimiento de la hifa en el tejido B) y C), invasión del tejido de la porción basal de las bayas D).