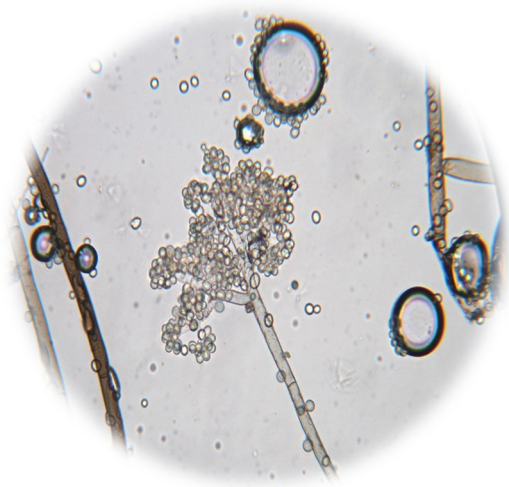


**Efecto de las heridas sobre la resistencia  
de frutos de pimiento a *Botrytis cinerea***

**Efecto das feridas sobre a resistencia de  
froitos de pemento a *Botrytis cinerea***

**Effect of wounding on pepper fruit  
resistance to *Botrytis cinerea***



Trabajo de fin de grado

Curso 2014/2015

Grado en Biología

Diego Gago Mesejo



D. JOSÉ DÍAZ VARELA, PROFESOR TITULAR DE FISIOLoxÍA VEGETAL, DOCTOR EN BIOLOGÍA, Y D. JAVIER VELOSO FREIRE, PROFESOR CONTRATADO INTERINO DE SUSTITUCIÓN DE FISIOLoxÍA VEGETAL, DOCTOR EN BIOLOGÍA, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, BIOLOGÍA VEXETAL E ECOLOXÍA DE LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMAN:

Que el presente Trabajo de Fin de Grado presentado por el alumno DIEGO GAGO MESEJO y titulado

" Efecto de las heridas sobre la resistencia de frutos de pimiento a *Botrytis cinerea*"

"Efecto das feridas sobre a resistencia de froitos de pemento a *Botrytis cinerea*"

"Effect of wounding on pepper fruit resistance to *Botrytis cinerea*"

ha sido realizado bajo su dirección y autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe en A Coruña, a 21 de Julio de 2015.



Fdo. José Díaz Varela



Fdo. Javier Veloso Freire

## ÍNDICE

	Página
1. Introducción	1
1.1 <i>Capsicum annuum</i> L.	1
1.1.1 Aspectos botánicos	1
1.1.2 Importancia agrícola y económica	1
1.2 Enfermedades del pimiento	2
1.2.1 <i>Botrytis cinérea</i>	3
1.2.1.1 Introducción	3
1.2.1.2 Ciclo de vida	4
1.3 Hormonas y resistencia a organismos patógenos	5
1.4 Heridas y calidad del fruto	6
1.5 Heridas, hormonas y resistencia a patógenos	6
2. Objetivos	9
3. Materiales y métodos	10
3.1 Material vegetal	10
3.2 Material fúngico	10
3.3 Realización de las heridas	10
3.4 Inoculación con <i>Botrytis cinerea</i>	10
3.5 Evaluación de los síntomas causados por <i>Botrytis cinerea</i>	10
3.6 Método de exposición al etileno	11
3.7 Extracción de muestras	11
3.8 Determinación de sólidos solubles	11
3.9 Determinación de compuestos fenólicos solubles totales	11
3.10 Muestreo de frutos de <i>Capsicum annuum</i> en diferentes establecimientos	12
3.11 Análisis estadístico	12
4. Resultados	13
4.1 Efecto de las heridas sobre la resistencia a <i>Botrytis cinerea</i>	13
4.2 Efecto de las heridas y etileno sobre la resistencia a <i>Botrytis cinerea</i>	13
4.3 Efecto de las heridas sobre los sólidos solubles totales	14
4.4 Efecto de las heridas sobre los de compuestos fenólicos solubles totales	14
4.5 Muestreo del estado de los frutos de <i>Capsicum annuum</i>	15
5. Discusión	16
6. Conclusiones	18
7. Bibliografía	19

## Resumen

Los frutos son productos perecederos que se encuentran expuestos de forma continua a factores que disminuyen su valor, tanto económico como nutricional, por lo que numerosos estudios se centran en cómo frenar o evitar su deterioro. En este estudio se intentó inducir resistencia frente a *Botrytis cinerea* en frutos de pimiento verde, *Capsicum annuum*, mediante la aplicación de heridas y heridas combinadas con etileno sobre la superficie del fruto. Se demostró que tanto las heridas, como la combinación de heridas y etileno no inducen resistencia a *Botrytis cinerea* en el fruto. Por el contrario las heridas aumentan la susceptibilidad del fruto, ya que al romper la cutícula eliminan la principal barrera defensiva del fruto frente a las infecciones por parte de organismos patógenos. Los análisis bioquímicos realizados sobre pimientos control y heridos mostraron que el contenido de compuestos fenólicos solubles totales permanecía inalterado mientras que el contenido de sólidos solubles totales registraba un aumento significativo en respuesta a las heridas. Además se realizó un muestreo en seis establecimientos comerciales con el fin de determinar si existen heridas u otros daños en los frutos a la venta, demostrándose que si existen diferencias en cuanto a la calidad de los frutos en función del establecimiento elegido.

## Resumo

Os froitos son produtos perecedeiros que se atopan expostos de forma continua a factores que diminúen o seu valor, tanto económico como nutricional, polo que numerosos estudos céntranse en como frear ou evitar o seu deterioro. Neste estudio intentouse inducir resistencia fronte a *Botrytis cinerea* en froitos de pemento verde, *Capsicum annuum*, mediante a aplicación de feridas e feridas combinadas con etileno sobre a superficie do froito. Demostrouse que tanto as feridas, coma a combinación de feridas e etileno non inducen resistencia a *Botrytis cinerea* nos froitos. Polo contrario, as feridas aumentan a susceptibilidade do froito, xa que ó romper a cutícula eliminan a principal barreira defensiva do froito fronte ás infeccións por parte dos organismos patóxenos. As análises bioquímicas realizadas sobre pementos control e feridos amosaron que o contido de compostos fenólicos solubles totais non cambiou, mais o contido en sólidos solubles totais rexistrou un aumento significativo en resposta as feridas. Ademais realizouse unha mostraxe en seis establecementos comerciais coa fin de determinar se existen feridas ou outros danos nos froitos á venda, demostrándose que si existen diferencias en canto á calidade dos froitos en función do establecemento escollido.

## Abstract

Fruits are perishable products that are constantly exposed to factors that decrease not only their economical value but their nutritional value too. That is why a high number of researches are based on the way we could stop or avoid their deterioration. In this research, we have tried to induce resistance to *Botrytis cinerea* in green pepper fruits, *Capsicum annuum*, by making wounds over the surface of the fruit and treating them with ethylene plus wounds. It has been determined that both, wounds and ethylene plus wounds do not induce resistance to *Botrytis cinerea* in the fruits. Indeed, wounds caused an increase in susceptibility, because they break the cuticle, the main fruit's defensive barrier against infections caused by pathogen organisms. Biochemical analysis we have carried out in control and wounded peppers revealed that the content of total soluble phenolic compounds remain unchanged, while the content of total soluble solids increased as a response to wounding. In addition, a comparative study was carried out, surveying six different supermarkets in order to determine if commercial fruits were wounded or damaged in other ways. We found differences in fruit quality among different supermarkets.

## 1. Introducción

### 1.1 *Capsicum annuum* L.

#### 1.1.1 Aspectos botánicos

Los pimientos son plantas herbáceas pertenecientes al género *Capsicum*, de la familia de las Solanáceas, con un ciclo de cultivo anual; su porte varía entre los 50 cm y los 2 m de altura. Su sistema radicular es pivotante y profundo, con numerosas raíces adventicias que pueden penetrar hasta 1 m en el suelo. Su tallo es recto y de crecimiento limitado, ramificándose cuando llega a una determinada altura que varía en función de la variedad y que continúa ramificándose de forma dicotómica hasta el final de su ciclo de vida. Las hojas son enteras, glabras y lanceoladas, de inserción alterna y tamaño variable en función de la variedad. Las flores aparecen de forma solitaria en cada nudo del tallo, insertadas en la base de las hojas. Los frutos son bayas huecas divididas en cámaras conectadas de número variable con un peso que oscila entre unos pocos gramos hasta más de 500 gramos. Su color depende de la variedad, pudiendo ser verdes, naranjas, rojos, amarillos, violetas o blancos. Las semillas se encuentran suspendidas en un cono invertido en la parte superior de las cámaras, de color amarillo pálido y de forma arriñonada su tamaño varía entre los 3 y 5 mm (Nuez *et al.*, 1996).

Actualmente existen 40 especies de pimiento distribuidas por las regiones tropicales y subtropicales de América. Los principales orígenes de esta diversidad se encuentran en México y en Mesoamérica. Cinco de estas especies han sido domesticadas, de las cuales la más importante es *Capsicum annuum* L. Las otras cuatro especies son *C. baccatum* L. y *C. pubescens* Ruiz & Pav., que fueron domesticadas en los Andes Peruanos y *C. chinense* Jacq. y *C. frutescens* L. que fueron domesticadas en la cuenca del Amazonas y en América central respectivamente. Las especies restantes solo han sido ocasionalmente utilizadas por el hombre pero constituyen un gran reservorio de genes de resistencia contra enfermedades y plagas (Adkins *et al.*, 2003)

#### 1.1.2 Importancia agrícola y económica

Desde hace décadas el pimiento supone uno de los cultivos más extendidos, constituyendo el quinto cultivo hortícola en cuanto a superficie cultivada se refiere y el octavo en cuanto a producción total (Nuez *et al.*, 1996; Díaz y Veloso, 2012). En el 2011 se produjeron en el mundo cerca de 30 millones de toneladas de fruto de pimiento anuales (F.A.O., 2015), siendo España el sexto país del mundo por producción (*Tabla 1*) y el segundo exportador a nivel mundial (*Figura 1*). Además el pimiento es uno de los cultivos hortícolas bajo invernadero con mayor superficie cultivada en nuestro país, concentrándose la producción en las costas de clima mediterráneo de las provincias de Almería, Alicante y Murcia.

Tabla 1- Producción mundial de fruto de pimiento en 2011 (F.A.O., 2015)

<b>País</b>	<b>Toneladas</b>
<b>China</b>	<b>15.545.683</b>
<b>México</b>	<b>2.131.740</b>
<b>Turquía</b>	<b>1.975.270</b>
<b>Indonesia</b>	<b>1.483.080</b>
<b>USA</b>	<b>1.018.490</b>
<b>España</b>	<b>898.260</b>
<b>Egipto</b>	<b>670.434</b>
<b>Nigeria</b>	<b>449.594</b>
<b>Argelia</b>	<b>400.000</b>
<b>Otros</b>	<b>5.366.478</b>
<b>Total</b>	<b>29.993.029</b>

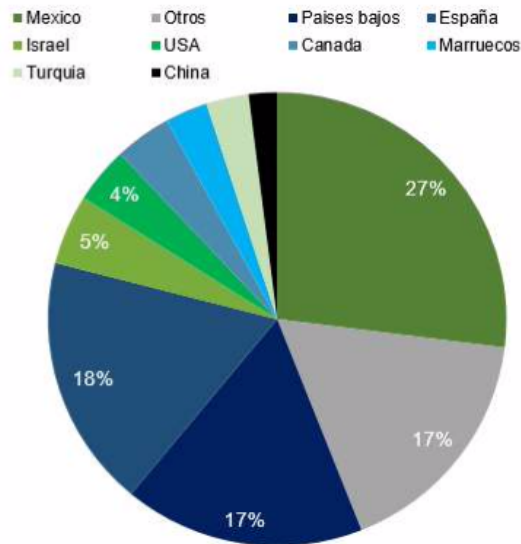


Figura 1. Exportaciones de pimientos en el mundo en 2011 (F.A.O., 2015)

El éxito del pimiento principalmente radica en que su producción va dirigida a cuatro destinos de consumo, en fresco, seco, pimentón y en conserva, muchos más que los que actualmente se le da a la mayoría de las frutas y verduras, que mayoritariamente suelen consumirse frescas, o en contadas ocasiones, en conserva (Infoagro, 2015). Recientemente los pimientos han ampliado aún más sus usos incorporándose al mundo de las plantas ornamentales, ya que algunas variedades enanas y con frutos pequeños pero de colores brillantes se están popularizando bajo el nombre de Ají decorativo, pudiéndose encontrar con facilidad en un gran número de establecimientos de jardinería (Figura 2).



Figura 2. Usos más habituales del fruto del pimiento. (A) Consumo fresco. (B) Consumo seco. (C) Molido para pimentón. (D) En conserva. (E) Como planta ornamental.

## 1.2 Enfermedades del pimiento

El pimiento al igual que otras plantas es susceptible a un gran número de enfermedades. Dependiendo del país y clima donde se cultive cada productor tiene que controlar una serie de patógenos y plagas que afectan al rendimiento y a la calidad del fruto. En nuestras latitudes se manifiestan diversas enfermedades que causan numerosas pérdidas (Tabla 2).

Tabla 2- Principales plagas y patógenos del pimiento.

Plagas	Patógenos
<i>Bemisia tabaci</i> Gennadius (Mosca blanca)	<i>Botrytis cinerea</i> Pers.:Fr. (Podredumbre gris)
<i>Frankliniella occidentalis</i> Pergande (Trips)	<i>Leveillula taurica</i> (Lév). G. Arnaud (Oidio)
<i>Helicoverpa armigera</i> Hubner (Heliothis)	<i>Phytophthora capsici</i> Leon. (Seca del pimiento)
<i>Myzus persicae</i> Sulzer Pulgones)	<i>Verticillium dahliae</i> Kleb.(Verticilosis del pimiento)
<i>Polyphagotarsonemus latus</i> Banks (Araña blanca)	Virus del bronceado del tomate (TSWV)
<i>Tetranychus urticae</i> V.L.Koch (Arana roja)	Virus del mosaico del tabaco (TMV)

Los frutos son productos hortícolas perecederos especialmente sensibles al deterioro durante las etapas de maduración y postcosecha, cuando las pérdidas aumentan debido a la propia senescencia de los frutos, a las enfermedades o al incorrecto almacenamiento de los mismos. Aunque existen multitud de factores que afectan al deterioro, la actividad microbiana es el factor más importante (Sommer, 1982). En los países desarrollados las pérdidas oscilan entre un 10-30 % anuales, mientras que en los países en vías de desarrollo las pérdidas suponen un 30-50% anual debido a la falta de saneamiento y refrigeración (Salunkhe *et al.*, 1991; Legard *et al.*, 2000).

## 1.2.1 *Botrytis cinerea*

### 1.2.1.1 Introducción

*Botrytis cinerea* es un hongo patógeno necrotrofo capaz de infectar a más de 200 especies en una gran variedad de órganos, incluyendo hojas, frutos y flores (Williamson *et al.*, 1995; Fernández-Acero *et al.*, 2011). El hongo causa la enfermedad del moho gris, que causa numerosas pérdidas en los cultivos en condiciones diversas, ya sea en campo abierto, en invernadero o en almacenamiento refrigerado a 0-10°C. Este patógeno es el principal responsable de las pérdidas pre y postcosecha de numerosos cultivos como tomate, bayas, uvas, flores cortadas y bulbos de flores (Elad, 1997; Williamson *et al.*, 2007).

*B. cinerea* se considera un hongo necrotrofo modelo, por lo que ha sido ampliamente estudiado y su genoma ha sido secuenciado (Elad *et al.*, 2004; van Kan, 2006). En el momento de la infección se caracteriza por desarrollar una capa grisácea semejante al moho (Figura 3).



Figura 3. Aspecto general que presenta el hongo *Botrytis cinerea* cuando se desarrolla sobre un fruto. (A) Sobre los frutos de frambuesa (*Rubus idaeus*). (B) Sobre un tomate (*Solanum lycopersicum*).



### 1.2.1.2 Ciclo de vida

*Botrytis cinerea* presenta el ciclo de vida típico de un hongo necrotrofo en el que se pueden distinguir varias fases en función de su estado (Figura 4).

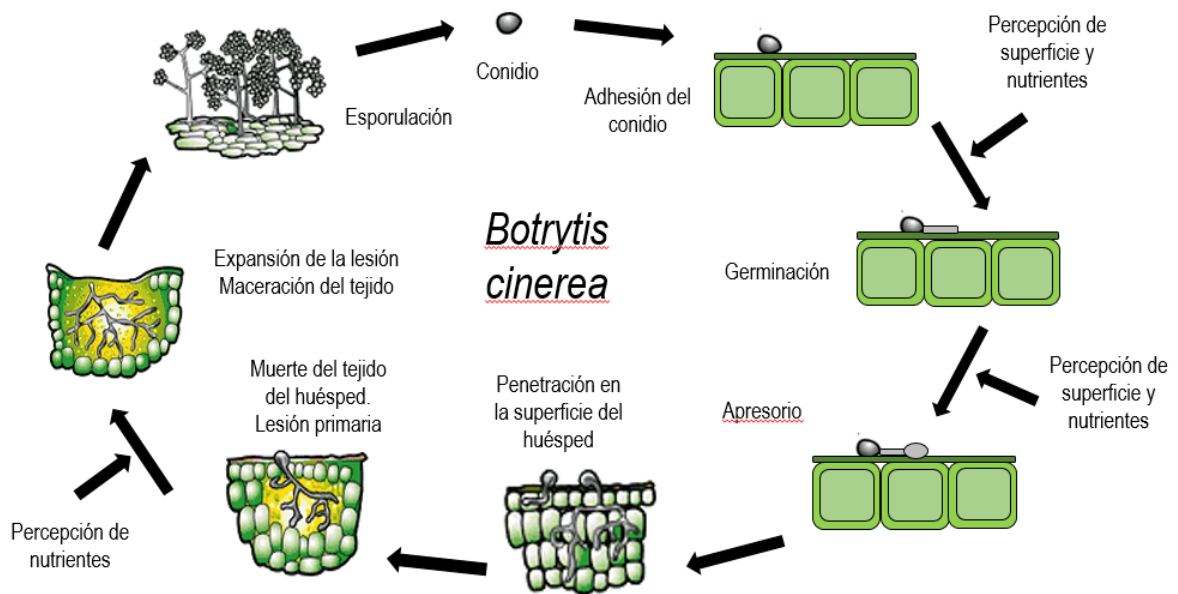


Figura 4. Ciclo de vida de *Botrytis cinerea*. Adaptado de [www.bayercropscience.com](http://www.bayercropscience.com).

Los conidios de *B. cinerea* pueden ser transportados a largas distancias a través del aire (Jarvis, 1977). El ciclo comienza cuando el conidio entra en contacto con la superficie de un hospedador susceptible. Se cree que la adhesión al huésped es mediada por interacciones de naturaleza física entre la cutícula del hospedador y el patógeno. Se distinguen dos etapas. En la primera el conidio se hidrata, dando como resultado la aparición de fuerzas débiles de adhesión debidas a la interacción hidrofóbica de la cutícula del huésped y la superficie del conidio (Doss *et al.*, 1993). En la segunda etapa se producen las uniones fuertes, unas horas después de la germinación del conidio (Doss *et al.*, 1995).

Numerosos factores influyen en la germinación del conidio. El agua libre en la superficie del huésped o una alta humedad ambiental (>93%) son esenciales para la germinación y penetración de la epidermis del hospedador (Williamson *et al.*, 1995). Los componentes gaseosos también pueden estimular la germinación. Se ha encontrado correlación entre los síntomas producidos por *B. cinerea* y la producción de etileno de sus huéspedes (Elad y Volpin, 1988). Se cree que el etileno puede favorecer el desarrollo de *B. cinerea* como consecuencia del debilitamiento del huésped provocado por la senescencia, así como estimulando directamente la germinación del conidio. En la germinación el conidio produce un tubo germinativo que termina en un apresorio (Figura 5).

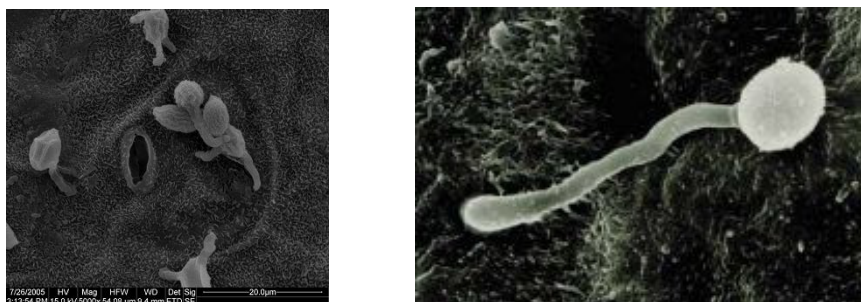


Figura 5. Germinación de los conidios de *Botrytis cinerea*.



La invasión del huésped puede realizarse por penetración activa o pasiva. *B. cinerea* es un hongo oportunista que puede colonizar zonas heridas o infectadas por otro patógeno. También puede entrar en la cavidad subestomática a través de un estoma abierto. Sin embargo es perfectamente capaz de penetrar a través de zonas intactas. La superficie del huésped está recubierta por una cutícula y una capa de cera. No se suelen observar daños mecánicos (Williamson *et al.*, 1995; Cole *et al.*, 1996) por lo que la penetración debe realizarse mediante un ataque enzimático (Salinas y Verhoeff, 1995; van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1997).

*B. cinerea* mata a las células del huésped antes de que sean invadidas por las hifas (Clark y Lorbeer, 1976). La invasión desencadena la muerte celular programada de las células dando lugar a una lesión primaria, lo cual puede ser un factor clave para el éxito de la infección (Govrin y Levine, 2000). Para lograr la muerte de las células utiliza diversos recursos como toxinas, ácido oxálico y la inducción de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). En otras ocasiones el hongo no produce la muerte del huésped, sino que queda en estado latente hasta que las condiciones de la infección sean propicias (Prusky, 1996). Esta situación puede darse en casos en los que *B. cinerea* infecta flores o frutos en formación, donde altos niveles de algunos compuestos como las fitoalexinas pueden detener su crecimiento. Al inicio de la etapa de maduración del fruto, cuando la concentración de estos compuestos ha disminuido, se reinicia el crecimiento del hongo. Tras el comienzo de la infección aparece una lesión necrótica que continuará en aumento a medida que avance el hongo por los tejidos de la planta. Posteriormente se produce una maceración de los tejidos seguida de la aparición de masas grises de conidios sobre la superficie del área afectada, cerrando así el ciclo.

### 1.3 Hormonas y resistencia a organismos patógenos

La susceptibilidad de una planta a un patógeno no solo depende de la relación específica huésped-patógeno sino que también depende del estado fisiológico de la planta. La maduración de los frutos es una de las etapas en las que la susceptibilidad aumenta. Durante el proceso de maduración se producen cambios hormonales y fisiológicos que dan lugar a cambios bioquímicos en el fruto (Giovannoni, 2004). Cambios en el pH y estado redox apoplástico, modificaciones en la composición y estructura de la pared celular, la conversión de almidón en azúcares simples y la reducción de la concentración de metabolitos antimicrobianos aumenta la susceptibilidad del fruto a ser infectado (Prusky y Lichter, 2007; Cantú *et al.*, 2008ab).

Durante la maduración el fruto sufre cambios importantes que son regulados por complejas rutas hormonales y de señalización celular. Las funciones de las hormonas de respuesta al estrés, etileno (ET), ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y ácido abscísico (ABA) en el control de los procesos de desarrollo de la planta y de los mecanismos de respuesta a patógenos han sido ampliamente estudiados en tejidos vegetativos (Doares *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 2002), sin embargo la relevancia de estas hormonas en la interacción planta-patógeno en el fruto aún no está clara.

El etileno es una hormona de naturaleza gaseosa implicada en procesos de abscisión de órganos, senescencia de hojas y flores y en el control de la maduración de los frutos (Giovannoni, 2004), por lo cual es ampliamente utilizado para promover la maduración de frutos climatéricos como la manzana o el tomate y para inducir la floración de ciertas familias como la Bromeliaceae, debido a su gran valor ornamental y culinario. Además regula la resistencia o susceptibilidad de las plantas ante los patógenos al intervenir tanto en procesos de inmunidad como en procesos que aumentan la susceptibilidad, y se suele utilizar como un regulador del crecimiento para obtener plantas más compactas, debido a su capacidad para inhibir el crecimiento en longitud de tallos y raíces.

El ácido jasmónico se sintetiza en la ruta octadecanoide a partir del ácido linolénico. Es una hormona con numerosas funciones que van desde intervenir en el desarrollo de las flores y en el proceso de maduración de los frutos de algunas especies hasta regular la respuesta inmune contra insectos y patógenos y aumentar la resistencia ante situaciones de estrés abiótico (Ballaré, 2011).

El ácido salicílico es un compuesto fenólico de naturaleza hormonal de gran importancia en la formación de defensas basales y de la resistencia adquirida, tanto a nivel local como sistémico (Durrant y Dong, 2004). Además está implicado en la activación de defensas contra biotrofos y hemibiotrofos, aunque también ha demostrado cierta eficacia en la defensa contra necrotrofos.

El ácido abscísico es una hormona que regula muchos aspectos del desarrollo de la planta, entre los que destacan la latencia de la semillas, la germinación y la respuesta al estrés abiótico (Fujita *et al.*, 2006). Para la interacción planta-patógeno se han descrito efectos tanto positivos como negativos en función del estado fisiológico de la planta o de las condiciones ambientales pero en general posee efectos negativos al promover la susceptibilidad mediante la inhibición de los efectos de ET, SA y JA.

#### 1.4 Heridas y calidad del fruto

Cuando se produce una herida en un fruto ciertos parámetros bioquímicos como son la capacidad antioxidante, el contenido en azúcares, los fenoles solubles totales, el ácido ascórbico o los carotenoides y antocianinas totales pueden verse alterados. Tras la aparición de la lesión, el fruto reacciona liberando grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS), implicadas en procesos de señalización celular, biosíntesis de lignina, formación de suberina y en la activación de las funciones de los sistemas antioxidantes (Reyes *et al.*, 2006). Los antioxidantes tienen como objetivo neutralizar las moléculas de ROS, evitando así que dañen las células y los tejidos del fruto.

Estudios recientes han demostrado que diversos compuestos fenólicos son los responsables de la alta capacidad antioxidante presente en frutas y verduras (Reyes *et al.*, 2006). Al someter a un fruto a estrés como puede ser una herida, el exceso o deficiencia de luz, temperatura o agua se produce una respuesta por la cual se acumulan compuestos fenólicos u otros metabolitos secundarios, reforzando las defensas del fruto. Además en algunas ocasiones, como se ha podido observar en este estudio, en la zona herida se produce un aumento significativo de la cantidad de azúcares presentes, lo cual es un factor que aumenta la susceptibilidad a hongos (Figura 6) (Mundy y Beresford, 2007). Sin embargo un aumento de la cantidad de azúcares es interesante desde un punto de vista comercial, por lo que podría considerarse como un aumento en la calidad del fruto, aunque este fuese más susceptible a ser infectado por organismos patógenos.

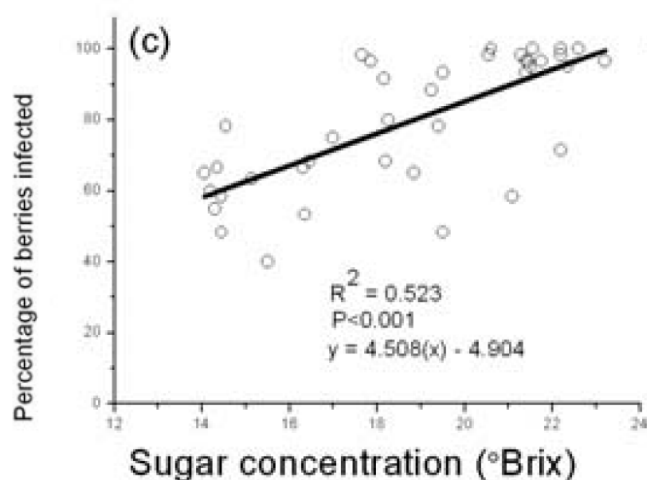


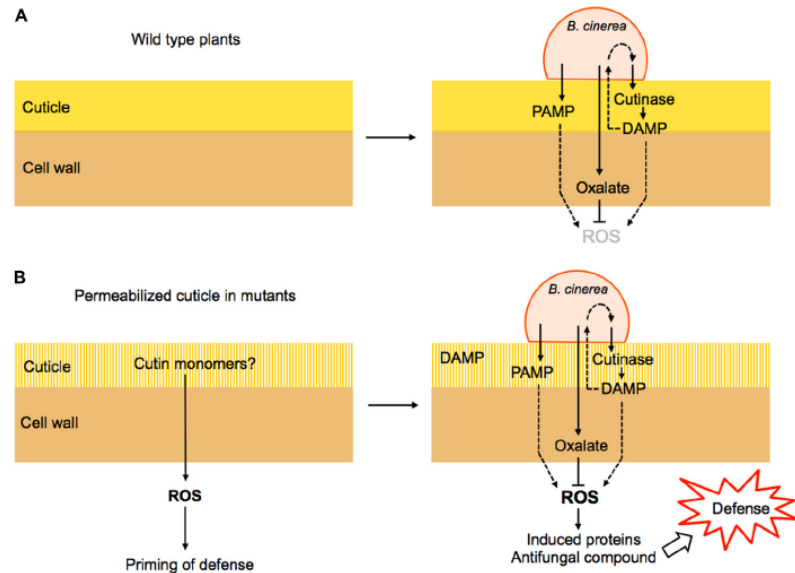
Figura 6. Correlación entre el contenido en azúcares del fruto y la susceptibilidad a *Botrytis cinerea*. Gráfica extraída de Mundy y Beresford, (2007).

#### 1.5 Heridas, hormonas y resistencia a patógenos

Los frutos, al igual que las hojas y los tallos de todas las plantas presentan una cutícula que los protege frente a la pérdida de agua y el estrés, tanto biótico como abiótico (Serrano *et al.*, 2014), de modo que la rotura de la misma hace al órgano vulnerable frente a posibles organismos patógenos. Su estructura y composición ha sido estudiada ampliamente y aunque entre las distintas especies su estructura puede variar, los componentes esenciales son los mismos. Su principal componente es la cutina, un poliéster que se encuentra parcialmente recubierto por ceras, tanto a nivel externo como interno. Esta unión entre ceras y cutina es la que recibe el nombre de cutícula. Bajo esta capa existe otro estrato compuesto por cutina y polisacáridos que se encuentran asociados con la pared celular.

Cuando un hongo patógeno infecta un fruto el paso previo a la penetración es la destrucción por vía mecánica o enzimática de la cutícula. En la degradación enzimática el hongo reconoce los monómeros de cutina en la superficie del fruto, activando su actividad cutinolítica mediante la secreción de cutinasas. Durante las primeras fases de la infección por hongos, como *Botrytis cinerea*, los productos derivados de la rotura de la cutícula por las cutinasas actúan como primeras señales de alarma que pueden ser reconocidas por la planta (Serrano *et al.*, 2014) desencadenando una resistencia tanto local como sistémica (Figura 7). Aunque este es un modelo que funciona en algunas especies como *Arabidopsis thaliana* no lo hace en el fruto del pimiento, por lo que el mecanismo debe ser diferente.

Figura 7. Modelo hipotético que explica las interacciones producidas en la cutícula en la creación de resistencia a *B. cinerea* en *Arabidopsis thaliana* (Serrano *et al.*, 2014). (A) En plantas de tipo salvaje *B. cinerea* libera cutinasas y PAMPs que provocan la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales promueve la activación de las defensas. Sin embargo la producción de oxalato por parte de *B. cinerea* interfiere en la producción de ROS, permitiendo la colonización. (B) En plantas modificadas genéticamente que producen ROS de forma continua, las defensas contra patógenos se activan de forma constitutiva. De este modo el oxalato segregado por *B. cinerea* resulta insuficiente, dando lugar a una defensa efectiva de la planta.



Las heridas se producen en las plantas de forma natural debido a herbívoros o al continuo estrés mecánico al que están sometidas. La aparición de una lesión implica la rotura mecánica de la cutícula, lo cual elimina la primera barrera física de la planta y provee de nutrientes al patógeno, facilitando enormemente la infección.

Las plantas no poseen células de defensa, pero cada célula tiene la capacidad de activar mecanismos reparadores y de defensa para evitar infecciones en caso de que se produzca una herida. La activación de estas defensas depende de que la planta reconozca ciertas señales de "peligro" como son los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). En el caso de las heridas realizadas de forma mecánica, como las aplicadas en este trabajo, la respuesta de la planta es similar a la desencadenada en presencia de un herbívoro (Savatin *et al.*, 2014) por lo que pueden servir como base para el estudio de las interacciones y las reacciones a nivel celular que se producen en caso de infección por un organismo patógeno como puede ser *Botrytis cinerea*. Los principales indicadores que reconoce la planta en caso de lesión son los restos degradados de la cutícula, como los monómeros de cutina, y de la pared celular, como son los péptidos y los oligogalacturónidos. Estas señales desencadenan una primera reacción de defensa a nivel local (respuesta local), mientras se genera una defensa general a nivel de la planta (respuesta sistémica). Durante este proceso se inducen un gran número de genes implicados en la biosíntesis de ácido jasmónico (JA), etileno (ET) y de respuesta al estrés.

En *Arabidopsis thaliana* se ha comprobado utilizando mutantes con el mecanismo de biosíntesis de cutícula dañado que una cutícula más permeable permite un mejor paso de inhibidores de crecimiento de hongos patógenos. Las heridas producidas sobre la superficie de una planta permiten que estos compuestos lleguen a la superficie, activando las defensas de la planta. Sin embargo la cutícula posee un importante papel como barrera física y una cutícula intacta es esencial para la salud de la planta, lo que hace necesario un correcto equilibrio entre barrera física y permeabilidad. En otro estudio con hojas de *Arabidopsis thaliana* se demostró que el calcio funciona como un primer mensajero a la hora de inducir la producción de ROS ante la presencia

de una lesión en la generación de resistencia contra *B. cinerea*. El calcio funciona como un mensajero genérico en numerosos procesos relacionados con el estrés en las plantas por lo que en este estudio se trató de determinar su papel en la transmisión de la señal en respuesta a la presencia de una lesión. Para comprobarlo se midió la concentración de calcio en una hoja control, una tratada con verapamil, un inhibidor de los canales de calcio, una tratada con oxalato y otra con EGTA, ambos agentes queladores del calcio. En la hoja control se produjo una alteración en los niveles de calcio tras ser herida seguida de una rápida producción de ROS, mientras que en las hojas tratadas con verapamil, oxalato y EGTA no se produjo esta variación en los niveles de calcio, lo que se tradujo en una pérdida en la capacidad de producción de ROS y por lo tanto un aumento en la susceptibilidad ante *B. cinerea*. Curiosamente se encontró que esta reacción solo se da en condiciones húmedas, ya que en condiciones secas se pierde la resistencia ante *Botrytis cinerea*. Esto se debe a que en condiciones secas tras la realización de las heridas en vez de acumularse ROS se acumula ácido abscísico, que está directamente relacionado con la pérdida de la producción de ROS (Beneloujaephajri *et al.*, 2013).

En *Arabidopsis thaliana*, las heridas causan una resistencia fuerte pero transitoria a *B. cinerea* en las hojas, pero el ácido jasmónico y el etileno no regulan esa respuesta (Chassot *et al.*, 2008). Sin embargo se encontró que la fitoalexina camalexina juega un papel crucial en la creación de resistencia frente a *Botrytis cinerea*. En mutantes de *A. thaliana* para la biosíntesis de camalexina las hojas no desarrollaron resistencia tras ser heridas e inoculadas con *Botrytis cinerea*. Además se demostró que herir una hoja no conllevaba la síntesis de camalexina, sino que esta solo se produce al inocular la herida con un organismo patógeno y que la respuesta generada variaba su intensidad en función del área dañada. Otro compuesto que resultó ser esencial para la resistencia a *B. cinerea* fue el glutatión (un agente reductor que neutraliza el efecto de las especies reactivas de oxígeno) ya que los mutantes con la  $\gamma$ - glutamilcisteína sintetasa dañada tampoco eran capaces de desarrollar resistencia, por lo que parece requerirse un nivel basal de glutatión para ser generada (Chassot *et al.*, 2008).

En hojas de pimiento se ha observado que la resistencia a *B. cinerea* cambia 72 h tras la realización de las heridas, aumentando la resistencia local y disminuyendo la sistémica. Se comprobó el papel que jugaban del etileno (ET) y el ácido jasmónico (JA) mediante el uso de inhibidores y se encontró que el etileno no afectaba a la hora de crear resistencia frente a *B. cinerea*, mientras que el ácido jasmónico si lo hacía, pero solo a nivel sistémico (García *et al.*, 2015). Respecto a la lignina y a los compuestos fenólicos la lignina aumentó a nivel local, pero disminuyó a nivel sistémico, mientras que los compuestos fenólicos no aumentaron a nivel local, pero también disminuyeron a nivel sistémico. Para terminar se analizaron tres genes defensivos, *CAPO1* (gen de la peroxidasa) fue inducido significativamente a nivel local, pero no a nivel sistémico, *CABPR1* (un gen que codifica una proteína defensiva) fue inducido significativamente a nivel local, pero reprimido a nivel sistémico, y *CASC1* (gen de biosíntesis de fitoalexinas) no fue inducido a nivel local pero su expresión cayó significativamente a nivel sistémico (García *et al.*, 2015).

En frutos de pimiento no se ha ensayado el efecto de las heridas sobre la resistencia a *B. cinerea*, por lo cual en este trabajo se procedió a su estudio.

## **2. Objetivos**

- Determinar el efecto que posee la aplicación de heridas sobre frutos de *Capsicum annuum* en la resistencia ante *Botrytis cinerea*, así como las variaciones que se producen en el contenido de sólidos solubles y compuestos fenólicos solubles totales en el área afectada.
- Medir la eficacia del etileno en la creación de resistencia a *Botrytis cinerea* en frutos de *Capsicum annuum*.
- Comprobar el estado de los frutos en diferentes establecimientos para valorar el riesgo de sufrir una infección, lo que afectaría al consumidor.

### **3. Material y métodos.**

#### **3.1 Material vegetal**

Para los dos primeros objetivos de este trabajo se han utilizado frutos de pimientos verdes tipo morrón de la especie *Capsicum annuum* L. Los frutos se obtuvieron de diferentes establecimientos comerciales seleccionándolos en base a sus características externas. Se evitaron frutos con heridas, infecciones, signos de deterioro y malformaciones.

#### **3.2 Material fúngico**

La especie seleccionada para infectar los frutos fue *Botrytis cinerea* Pers: Fr., cepa B0510, cedida por el Dr. Jan van Kan (Universidad de Wageningen, Países Bajos). El hongo fue cultivado en placas utilizando medio de cultivo PGA (patata, glucosa, agar) durante un promedio de 5 días a 24°C en oscuridad.

#### **3.3 Realización de las heridas**

Los frutos de pimiento se lavaron con agua y se secaron con papel.

En los experimentos de resistencia a *Botrytis cinerea* las heridas siguieron un patrón en forma de cuadrado de 5 pinchazos por 5 pinchazos, dando lugar a un área herida de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>. Cada pimiento se hirió de esta forma en 5 zonas diferentes con el fin de homogeneizar los posibles resultados y de evitar diferencias fisiológicas entre las distintas partes del fruto. Los frutos fueron heridos en tres tiempos diferentes antes del momento de la inoculación, 24 horas, 4 horas y 15 minutos, además de un pimiento control que se mantuvo sin heridas durante 24 horas. Los pimientos fueron incubados en una cámara de cultivo durante esas 24 horas con un fotoperíodo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, 25 °C diurnos y 18 °C nocturnos hasta el momento de la inoculación.

En los experimentos para la determinación de sólidos solubles y de compuestos fenólicos totales el patrón de las heridas a realizar fue algo diferente, ya que se crearon dos filas longitudinales en cada uno de los pimientos y en cada fila se realizaron 5 cuadrantes de 5x5 pinchazos en un área de 1 cm<sup>2</sup>, de modo que cada pimiento acabó teniendo 10 áreas heridas. Los frutos fueron heridos 24 horas antes de practicarles los análisis.

#### **3.4 Inoculación con *Botrytis cinerea***

Se utilizó un sacabocados para obtener secciones circulares del cultivo de *Botrytis cinerea*. Cada sección fue depositada sobre zonas heridas en el fruto, con el lado del micelio en contacto con la superficie del fruto. En los frutos control se depositaron siguiendo el mismo patrón de localización espacial que en los frutos heridos.

Finalmente todos los frutos se colocaron en cámaras de humedad individuales. Estas cámaras consistían en una caja de plástico sobre la que se depositó agua en el fondo y dos tiras de papel sobre el agua con el fin de ayudar a incrementar la superficie de evaporación. Cada pimiento se depositó en una bandeja de plástico, se introdujo en la cámara y se tapó. Las cámaras se incubaron en el laboratorio a temperatura ambiente y al cabo de 4, 5 o 6 días se evaluaron los síntomas.

Se realizaron tres experimentos independientes con una réplica (un fruto) por tratamiento y experimento.

#### **3.5 Evaluación de los síntomas causados por *Botrytis cinerea***

El diámetro de las áreas necrosadas por el hongo se midió utilizando un calibre electrónico conectado a un ordenador. En el caso de áreas irregulares se tomaron dos medidas, una por la parte más ancha y otra por la más estrecha, para luego hacer la media.

### 3.6 Método de exposición al Etileno

Para la aplicación del Etileno se comenzó dividiendo los pimientos en 4 grupos:

- 1- Pimiento control.
- 2- Pimiento con heridas.
- 3- Pimiento con Etileno.
- 4- Pimiento con heridas y Etileno.

El Etileno utilizado para el experimento se encontraba inicialmente en forma de Etefón (Ácido 2-Cloroetilfosfónico), un compuesto que libera Etileno a un pH mayor de 5. Para lograr la liberación del Etileno el Etefón se expuso a un pH 7, lo cual se consiguió mediante tampón fosfato 0,5 M pH 7,0.

La exposición al etileno se aplicó en el mismo momento en el que se practicaron las heridas, 24 horas antes de la inoculación

Al ser el Etileno un gas las cajas donde se guardaron los pimientos estaban selladas. Cada pimiento se introdujo en una caja estanca individual. Las cajas que contienen el pimiento control y el pimiento con heridas se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 horas. En las cajas restantes, pimiento con Etileno y pimiento con heridas y Etileno, tras introducir los pimientos se depositó en su interior un vaso con 10 ml de tampón fosfato 0,5 M pH 7,0, para acto seguido introducir en el vaso 3,7 µl de un producto comercial de Etefón (Ethrel 48®, Nufarm). Las cajas se sellaron y se incubaron como las otras a temperatura ambiente durante 24 horas.

Los frutos se inocularon con *Botrytis cinerea* y se evaluaron los síntomas tal y como se indica en los apartados 3.4 y 3.5.

Se realizaron dos experimentos independientes con una réplica (un fruto) por tratamiento y experimento.

### 3.7 Extracción de muestras

Con ayuda de un sacabocados se extrajeron las muestras, 10 por pimiento. En el caso de los pimientos heridos las muestras se extrajeron de las zonas heridas, mientras que en el caso de los pimientos control se extrajeron siguiendo el mismo patrón espacial que el de los pimientos heridos. De los 10 discos de cada pimiento 5 se pesaron y se envolvieron en papel de aluminio para ser congelados a -20°C hasta el análisis de compuestos fenólicos. Los otros 5 discos se destinaron inmediatamente a la medida de sólidos solubles.

### 3.8 Determinación de sólidos solubles

Para extraer el zumo de pimiento de los 5 discos se utilizó una jeringa. Las muestras se depositaron en el interior de la jeringa y se presionó con el émbolo hasta que salía el zumo. La solución resultante fue medida utilizando un refractómetro.

Los resultados se expresan en grados Brix (°Brix), que expresan el porcentaje de sólidos solubles presentes en un líquido equivalentes a una solución de sacarosa con esa concentración en % peso/volumen medida a 20°C.

### 3.9 Determinación de compuestos fenólicos solubles totales

Cada muestra (aproximadamente 4 g) se homogeneizó en un mortero con unos 10 ml de metanol al 80%. Se recogió el homogenizado en un frasco y se lavó el mortero con 5 ml de etanol al 80% para recuperar los restos del homogenizado. Los frascos se incubaron a 70°C durante 15 minutos y posteriormente se enfriaron en hielo. Utilizando un embudo con papel de laboratorio se filtraron los extractos, recogiendo el filtrado en una probeta.



Los extractos se enrasaron a 20 ml y se usaron como muestras para medir el contenido en compuestos fenólicos solubles totales.

Para determinar los compuestos fenólicos se siguió el método de Singleton & Rossi (1965).

Se prepararon varios tubos eppendorf, uno para el blanco y tres réplicas para cada muestra del experimento. En el tubo del blanco se depositaron 50  $\mu$ l de metanol al 80%. En los tubos de la muestra se depositaron 10  $\mu$ l de muestra y 40  $\mu$ l de metanol al 80%. Posteriormente se añadieron 750  $\mu$ l de agua destilada a cada tubo, y a continuación 50  $\mu$ l de reactivo Folin-Ciocalteu. La solución se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Tras ello se añadieron 150  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente se ajustó la absorbancia a cero en el espectrofotómetro con el blanco, y se midió la absorbancia del contenido de los otros tubos a 760 nm.

A la vez que se midieron los fenoles solubles de este experimento, se preparó una recta de calibrado con un fenol estándar, el ácido gálico. Dicha recta nos permitió calcular la cantidad de fenoles presentes en las muestras. Para realizar la recta se utilizaron cuatro soluciones de ácido gálico: 0,01 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,05 mg/ml y 0,1 mg/ml. Las mezclas de reacción se prepararon y se midieron como se hizo con las muestras.

### 3.10 Muestreo de frutos de *Capsicum annuum* en diferentes establecimientos

Para llevar a cabo el muestreo se seleccionaron seis establecimientos comerciales. Debido a que no todos los supermercados poseen la misma cantidad de frutos el método consistió en la realización de 3 muestreos en días alternos, con el fin de evitar muestrear los mismos frutos, hasta muestrear un total de 50 frutos por establecimiento. Los frutos se clasificaron en 6 categorías en base a sus características externas.

- Heridas
- Necrosis
- Golpes
- Pérdida de turgencia
- Heridas + Necrosis
- Perfectos

### 3.11 Análisis estadístico

Para realizar los análisis estadísticos necesarios se utilizaron los programas informáticos Excel 2013 y Statgraphics 5.1. Con el programa Excel se realizaron las pruebas t de Student ( $\alpha= 0,05$ ) para medir los sólidos solubles y los compuestos fenólicos solubles totales. Con el programa Statgraphics se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía ( $\alpha= 0,05$ ), un test de Duncan y una prueba de Kruskal- Wallis del efecto de las heridas sobre la resistencia a *B.cinerea*, un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías ( $\alpha= 0,05$ ) del efecto de heridas y etileno sobre la resistencia a *B. cinerea* y una prueba  $\chi^2$  de Pearson ( $\alpha= 0,05$ ) para el muestreo de los seis establecimientos comerciales.

## 4. Resultados

### 4.1 Efecto de las heridas sobre la resistencia a *Botrytis cinerea*

En el experimento se determinaron las áreas infectadas al cuarto y quinto día (Figura 8) de la inoculación por ser el momento en el que mejor se observaban los resultados. En todos los casos el fruto control presentó una infección significativamente menor. Mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y un test de Duncan para los 4 días se comprobó que existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos a 4 ( $p=0,0045$ ). Sin embargo con una prueba de Kruskal-Wallis a los 5 días no se encontraron diferencias entre los tratamientos.

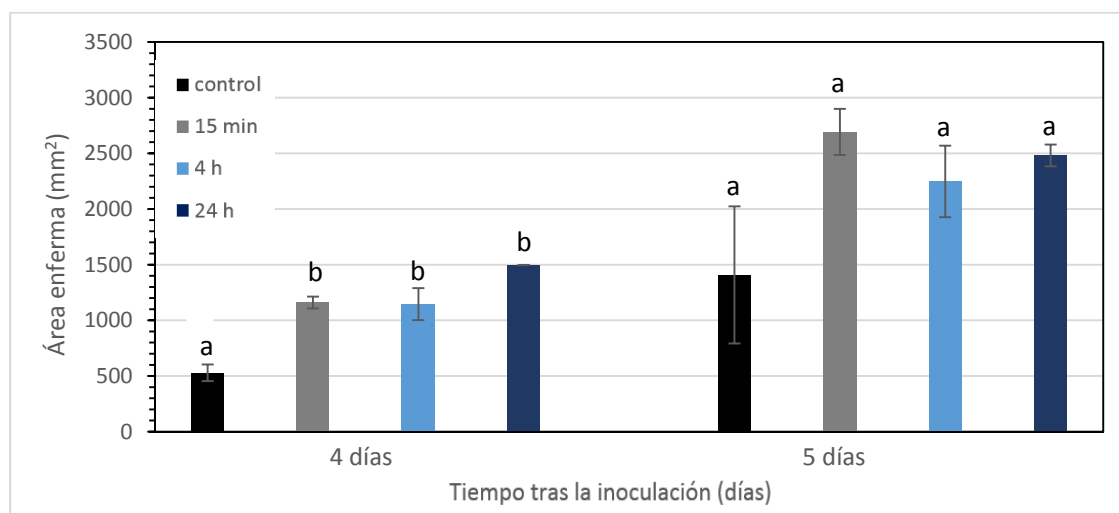


Figura 8. Efecto de las heridas sobre el área del fruto con síntomas causados por *Botrytis cinerea* a los 4 y 5 días de la inoculación. En la figura se representan las medias  $\pm$  error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas en un test de ANOVA seguido de un test de Duncan a los 4 días ( $\alpha=0,05$ ) y una prueba de Kruskal-Wallis a los 5 días ( $\alpha=0,05$ ).

### 4.2 Efecto del etileno y las heridas sobre la resistencia a *Botrytis cinerea*

En el experimento se trató de probar la eficacia del etileno en la generación de una respuesta por parte del fruto ante *Botrytis cinerea*. Las zonas afectadas por la infección se midieron en un experimento a los 5 días post inoculación y en otro experimento a los 6 días post inoculación debido a un retraso en el tiempo de infección del fruto. Los frutos tratados con etileno mostraron un nivel de infección igual que los no tratados. Los frutos tratados con heridas mostraron un nivel de infección significativamente mayor que los no heridos. El análisis de varianza (ANOVA) de dos vías también mostró que no hay interacciones significativas entre etileno y heridas. (Figura 9).

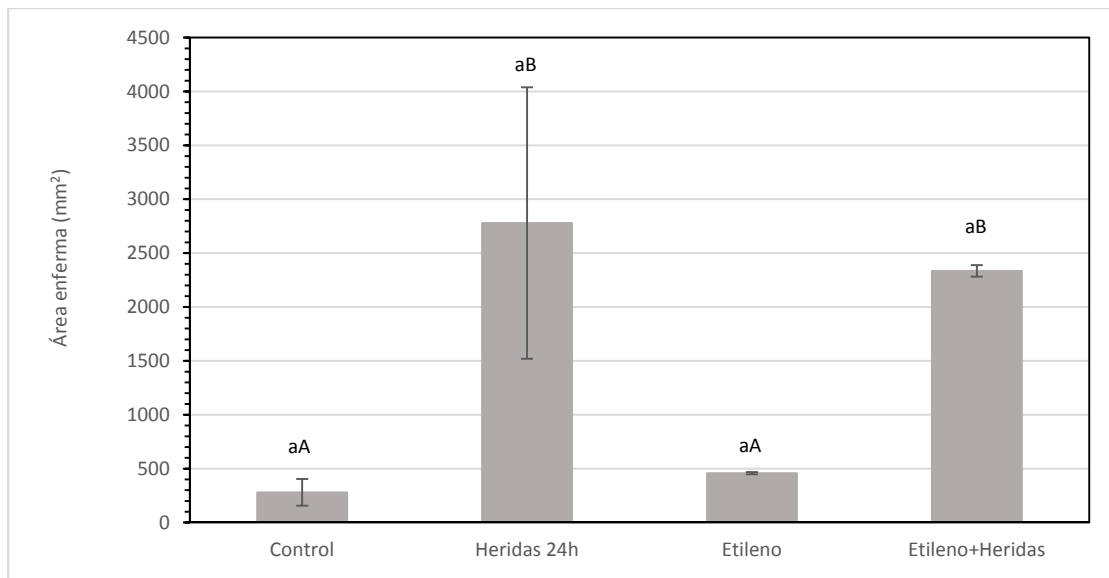


Figura 9. Efecto de las heridas y el etileno sobre el área con síntomas causados por *Botrytis cinerea* a los 5/6 días post inoculación. En la figura se representan las medias  $\pm$  error estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre los tratamientos con y sin etileno. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias entre los tratamientos con y sin heridas ( $\alpha=0,05$ ).

#### 4.3 Efecto de las heridas sobre los sólidos solubles totales

Para medir la cantidad de sólidos solubles totales, de los cuales una gran parte corresponde a azúcares, se tomaron muestras de frutos control y frutos con heridas. En todos los casos los frutos con heridas presentaron un mayor contenido en sólidos solubles. Mediante la prueba t de Student se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $p=0,0039$ ) (Figura 10).

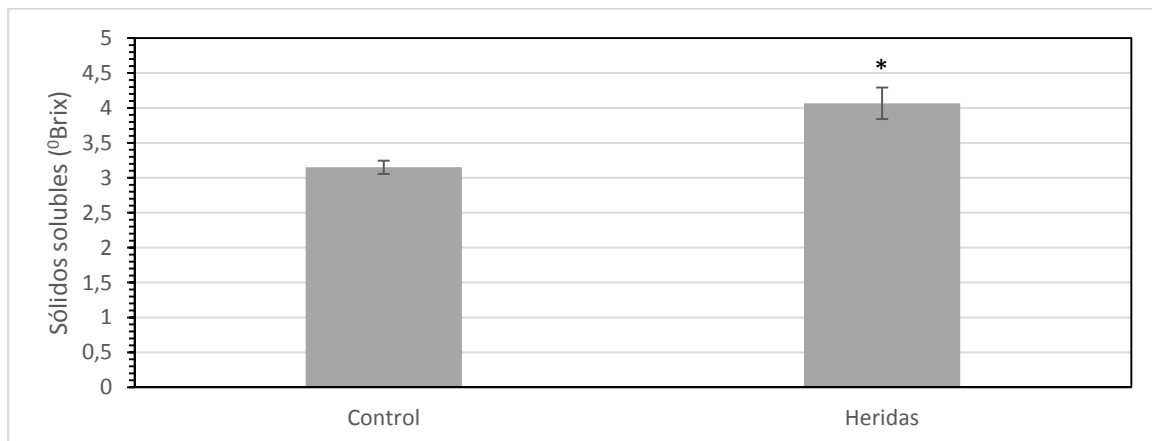


Figura 10. Efecto de las heridas sobre los sólidos solubles totales. En la figura se representan las medias  $\pm$  error estándar. El asterisco indica que se observa una diferencia estadísticamente significativa mediante la prueba t- student ( $\alpha=0,05$ ).

#### 4.4 Efecto de las heridas sobre los compuestos fenólicos solubles totales

A la hora de medir la presencia de compuesto fenólicos se dividieron los frutos en dos grupos, control y heridas. Aparentemente los frutos con heridas presentaban una mayor cantidad de compuestos fenólicos, pero tras la realización de la prueba t de Student se comprobó que no había diferencias significativas ( $p=0,1791$ ) (Figura 11).

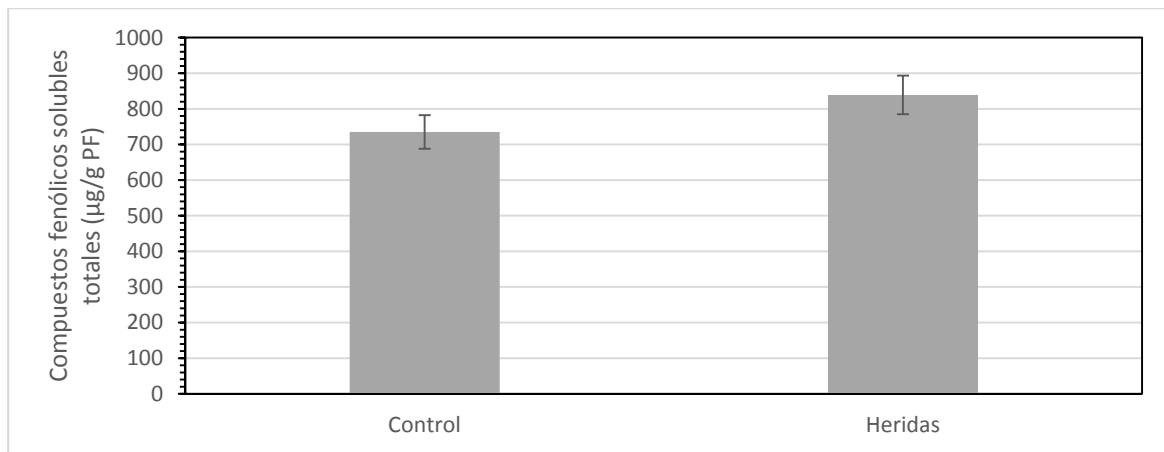


Figura 11. Efecto de las heridas sobre los compuestos fenólicos. En la figura se representan las medias  $\pm$  error estándar. No se observan diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba t- student ( $\alpha=0,05$ ).

#### 4.5 Muestreo del estado de los frutos de *Capsicum annum*

Del muestreo realizado en seis establecimientos comerciales se concluye que hay diferencias entre los distintos establecimientos respecto a la calidad de los frutos de pimiento ofertados. Se realizó una prueba  $\chi^2$  cuadrado de Pearson en la que se demostró que si existe relación entre los establecimientos ( $p= 0,0044$ ) y el estado de los frutos, siendo el establecimiento C el causante de las diferencias al presentar una mayor calidad en sus frutos (Tabla 3).

Tabla 3- Resultados del muestreo realizado en seis establecimientos comerciales sobre el estado de los frutos.

ESTADO DEL FRUTO	ESTABLECIMIENTO					
	A	B	C	D	E	F
Heridas	7	9	1	13	8	9
Perdida de turgencia	3	2	0	0	0	0
Necrosis	1	0	0	2	0	0
Heridas/Necrosis	0	0	0	0	0	0
Golpes	5	6	2	0	3	1
Perfecto	34	33	47	35	39	40

## 5. Discusión

Al contrario que estudios anteriores en los que se demostraba que era posible inducir resistencia a *Botrytis cinerea* mediante heridas en hojas de *Capsicum annuum* (García *et al.* 2015) y *Arabidopsis thaliana* (Chassot *et al.*, 2008) los resultados obtenidos muestran que la presencia de heridas no aumenta la resistencia ante *Botrytis cinerea* en los frutos de pimiento, sino que la disminuye. De hecho se ha observado que las heridas en los frutos de otras especies aumentan el riesgo de infección por *Botrytis cinerea* (Mundy y Beresford, 2007) al facilitar la entrada directa del patógeno (Savatin *et al.*, 2014) y al incrementar la cantidad de azúcares disponibles para el hongo, lo que favorece su crecimiento. En el control de nuestros experimentos los síntomas fueron menores, posiblemente debido a que al estar la cutícula intacta *Botrytis cinerea* necesite más tiempo para atravesarla y comenzar la infección, teniendo que invertir tiempo y recursos en romper la superficie del fruto. La razón por la cual existen estas diferencias en la respuesta de hoja y fruto de pimiento es una cuestión que todavía no está clara. Es posible que al ser el fruto un medio de protección y dispersión de las semillas el estado de maduración de las mismas influya de forma decisiva en la susceptibilidad del fruto ante las infecciones, ya que en este caso aunque el fruto aún permanece verde es muy posible que las semillas ya sean viables, y que por lo tanto ya no sea necesario protegerlas de una posible infección. Para comprobar esta teoría habría que aplicar las heridas sobre frutos en distintas etapas del desarrollo aun sobre la planta madre, ya que también es posible que de crearse algún tipo de resistencia ante las heridas, esta capacidad se pierda al seccionar el fruto de la planta.

En el experimento que pretendía determinar la eficacia del etileno en la inducción de resistencia a *Botrytis cinerea* se concluye que el etileno no parece tener ningún efecto sobre el avance del hongo. De nuevo se repiten los resultados del primer experimento, de modo que los frutos que no presentan heridas, el control y el tratado con etileno, presentaron síntomas menores que los frutos heridos. El etileno juega un papel fundamental a la hora de inducir resistencia frente a patógenos como *Botrytis cinerea* en hojas de tomate (Díaz *et al.*, 2002), una planta con fruto climatérico. Sin embargo al ser el fruto del pimiento un fruto no climatérico el etileno no desempeña un papel relevante en la maduración del fruto, lo cual explica los resultados obtenidos. En los frutos climatéricos el etileno influye de forma clave en la maduración de los frutos. En un estudio con tomates (*Solanum lycopersicum*) se confirmó que el etileno influía en la maduración de los frutos, pero que su papel en cuanto a crear susceptibilidad frente a *Botrytis cinerea* difería mucho entre frutos maduros y verdes. Para probarlo se utilizaron una serie de mutantes, *RIN* (inhibidor de la maduración), *NOR* (no maduración) y *Nr* (un mutante del receptor de etileno *LeETR3*) en dos grupos de tomates, rojos/maduros (RR) y verdes/inmaduros (MG) que fueron heridos e inoculados con *B. cinerea*. Analizando los resultados se dedujo que la susceptibilidad a *B. cinerea* depende de *NOR* y parcialmente de la percepción de etileno.

Los sólidos solubles totales aumentaron en todos los frutos que presentaban heridas. Los °Brix son una medida ampliamente utilizada para medir la cantidad de sólidos solubles totales, la mayoría azúcares en el caso de frutas y verduras, debido a la sencillez del método de obtención y a la importancia que posee el contenido en azúcares en estos productos. Cada país posee sus propios estándares de calidad en función del cultivo y variedad del mismo que se esté analizando, lo cual hace muy subjetiva la clasificación de un producto en de buena, normal o mala calidad únicamente en función del contenido en azúcares. En nuestros experimentos el contenido en azúcares de los frutos de pimiento verdes osciló entre 3 y 4 °Brix, un contenido posiblemente aceptable en nuestro país, sin embargo en otros países como Nueva Zelanda este contenido resultaría insuficiente, ya que en este país el contenido en azúcares considerado aceptable oscila entre 6 y 9 °Brix (Kleinhenz y Bumgarner, 2012), no especificando si la medida fue realizada en pimientos verdes o maduros. Además los frutos de pimiento con heridas tienen un mayor contenido en azúcares, lo que los hace más susceptibles de ser infectados por *B. cinerea*, por lo que es posible que cuanto mayor sea el contenido de azúcar típico de una variedad de pimiento más susceptible sea a las infecciones.

Respecto a la concentración de compuestos fenólicos totales esta permaneció estable tras la aplicación de heridas. Este resultado se ha repetido en otros estudios, donde se analizó la concentración de compuestos fenólicos en hojas de pimiento heridas (Díaz y Merino, 1997; García *et al.*, 2015). Otro estudio sugiere que las heridas pueden aumentar o reducir la concentración de compuestos fenólicos antioxidantes dependiendo de la especie, los niveles iniciales de ácido ascórbico reducido y fenoles solubles (Reyes *et al.*, 2006). En este estudio se analizó como variaban los compuestos fenólicos en distintas especies vegetales, y encontraron que mientras que especies como la lechuga, la zanahoria o la batata la concentración aumentaba con las heridas, en otras especies como la patata, el repollo blanco o los rábanos la concentración disminuía.

El muestreo realizado en seis establecimientos mostró que la calidad de los frutos de pimiento verde varía de forma significativa en función del establecimiento. Este hecho afecta directamente al consumidor, ya que si adquiere este producto en los establecimientos donde la calidad es peor, ya sea por presentar lesiones, pérdida de turgencia o directamente frutos en mal estado que presenten infecciones, la durabilidad del fruto se verá afectada, reduciendo así el tiempo que el consumidor posee para hacer uso del mismo. Por otro lado en este trabajo se ha visto que las heridas en los frutos aumentaban significativamente el contenido de azúcar de los mismos, un factor que a menudo es apreciado por los consumidores, ya que dota al fruto de un mejor sabor. De este modo se puede concluir que las heridas en los frutos aportan tanto ventajas como desventajas, siendo el consumidor el que finalmente debe decidir qué estado le resulta más apetecible y aprovechable.

## 6. Conclusiones

1. La aplicación de heridas sobre frutos de pimiento verde, *Capsicum annuum* L., disminuye la resistencia frente a la infección por *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. y no influye sobre la concentración de compuestos fenólicos solubles totales, pero si incrementa de forma significativa la cantidad de sólidos solubles totales en el área infectada del fruto.
2. La aplicación de etileno sobre frutos de pimiento verde no induce resistencia frente a *Botrytis cinerea*.
3. Se observó que el estado de los frutos varía en función del establecimiento donde se adquieran, por lo que también puede existir un mayor o menor riesgo de que estos sean infectados, con los posibles trastornos o ventajas que esto pueda ocasionarle al consumidor.



## 7. Bibliografía

- Aminifard M. H., Aroiee H., Azizi M., Nemati H. & Jaafar H. Z. E.** (2013). Effect of compost on antioxidant components and fruit quality of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Central European Agriculture* **14**, 47-56.
- Ballaré C. L.** (2011). Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. *Trends in Plant Science* **16**, 249–257.
- Beneloujaephajri E., Costa A., L'Haridon F., Métraux J.-P. & Binda M.** (2013). Production of reactive oxygen species and wound-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Botrytis cinerea* are preceded and depend on a burst of calcium. *BMC Plant Biology*. **13**, 160.
- Beyers T., Vos C., Aerts R., Heyens K., Vogels L., Seels B., Höfte M., Cammue B. P. A. & De Coninck B.** (2014). Resistance against *Botrytis cinerea* in smooth leaf pruning wounds of tomato does not depend on major disease signalling pathways. *Plant Pathology* **63**, 165-173.
- Blanco-Ulate B., Vincenti E., Powell A. L. T., Cantu D.** (2013) Tomato transcriptome and mutant analyses suggest a role for plant stress hormones in the interaction between fruit and *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science* **4**, 142.
- Bosland P. W.** (2003). Introducción. Compendium of Pepper diseases. *The American Phytopathological Society*. Stm Paul, Minnesota, EE.UU.
- Cantu D., Vicente A. R., Greve L. C., Dewey F. M., Bennett A. B., Labavitch J. M., et al.** (2008a). The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Proceeding of the National Academy of Sciences U.S.A.* **105**, 859–864.
- Cantu D., Vicente A. R., Labavitch J. M., Bennett A. B. & Powell A. L. T.** (2008b). Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends in Plant Science* **13**, 610–617.
- Chan Z.** (2013) Proteomic responses of fruit to environmental stresses. *Frontiers in Plant Science* **3**, 311.
- Chassot C., Buchala A., Schoonbeek H., Métraux J. P. & Lamotte O.** (2008) Wounding of *Arabidopsis* leaves causes a powerful transient protection against *Botrytis* infection. *The Plant Journal* **55**, 555-567.
- Clark, C.A. & Lorbeer, J.W.** (1976). Comparative histopathology of *Botrytis squamosa* and *B. cinerea* on onion leaves. *Phytopathology* **66**, 1279-1289.
- Cole, L., Dewey, F.M. & Hawes, C.R.** (1996). Infection mechanisms of *Botrytis* species: Pre-penetration and pre-infection processes of dry and wet conidia. *Mycological Research* **100**, 277-286.
- Díaz J. & Merino F.** (1995). Wound-induced shikimate dehydrogenase and peroxidase related to lignification in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology* **152**, 51-57.
- Díaz J., ten Have A. & van Kan J. A. L.** (2002). The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **129**, 1341-1351.
- Díaz J. & Veloso J.** (2012). Perspectivas da introducción de resistencia a enfermidades do pemento. 2ª y 3ª Xornadas técnicas sobre do pemento do couto. *Deputación da Coruña e Concello de Narón*. A Coruña, Galicia, España.
- Doares S. H., Narvaez-Vasquez J., Conconi A. & Ryan C. A.** (1995). Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiology* **108**, 1741–1746.

- Doss, R.P., Potter, S.W., Chastagner, G.A. & Christian, J.K.** (1993). Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1786-1791.
- Doss, R.P., Potter, S.W., Soeldner, A.H., Christian, J.K. & Fukunaga, L.E.** (1995). Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 260-265.
- Durrant W. E. & Dong X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 185–209.
- Elad Y.** (1997). Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. *Biological Reviews of Cambridge Philosophical Society* **72**, 381–422.
- Elad & Volpin** (1988). The involvement of ethylene and calcium in gray mold of pelargonium, ruscus and rose plants. *Phytoparasitica* **16**, 119-131.
- Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. & Delen N.** (2004). *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems. En: *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. & Delen N., Eds.). Kluwer academic publishers. Dordrecht, Países Bajos.
- F.A.O.** (2015). FAOSTAT. <http://faostat3.fao.org/home/S> (16/07/2015)
- Fernández-Acero F. J., Carbú M., El-Akhal M. R., Garrido C., González-Rodríguez V. E. & Cantoral J. M.** (2011). Development of proteomics-based fungicides: new strategies for environmentally friendly control of fungal plant diseases. *International Journal of Molecular Science* **12**, 795–816.
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., et al.** (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Plant Biol.* **9**, 436–442.
- García T., Gutiérrez J., Veloso J., Gago-Fuentes R. & Díaz J.** (2015). Wounding induces local resistance but systemic susceptibility to *Botrytis cinerea* in pepper plants. *Journal of Plant Physiology* **176**, 202-209.
- Giovannoni J. J.** (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* **16**, 170–180.
- Govrin, E. & Levine, A.** (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biol.* **10**, 751-757.
- Jarvis, W.R.** (1977). *Botryotinia and Botrytis species - Taxonomy, physiology and pathogenicity*. Ottawa, Research Branch, Canada Department of Agriculture.
- Kleinhenz M. D. & Bumgarner N. R.** (2012). Using °Brix as an indicator of vegetable quality linking measured values to crop management. The Ohio State University, EE.UU.
- Legard D. E., Xiao C. L., Merteley J. C. & Chandler C. K.** (2000). Effects of plant spacing and cultivar on the incidence of *Botrytis* fruit rot in annual strawberry. *Plant Disease* **84**, 531–538
- Montalvo-González E., González-Espinoza N. G., García-Galindo H. S., Tovar-Gómez B. & Mata-Montes de Oca M.** (2009). Efecto del etileno exógeno sobre la desverdización del chile “poblano” en poscosecha. *Chapingo Serie Horticultura* **12**, 189-197.
- Mundy D. C. & Beresford R. M.** (2007). Susceptibility of grapes to *Botrytis cinerea* in relation to berry nitrogen and sugar concentration. *New Zealand Plant Protection* **60**, 123-127.
- Nuez F., Gil Ortega R. & Costa J.** (1996). *El cultivo de pimientos, chiles y ajíes*. Mundi Prensa Libros S.A. España.

- Peng H., Yang T. & Jurick W. M.** (2014). Calmodulin gene expression in response to mechanical wounding and *Botrytis cinerea* infection in tomato fruit. *Plants* **3**, 427-441.
- Prusky, D.** (1996). Pathogen quiescence in post-harvest diseases. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 413-434.
- Prusky D., Lichter A.** (2007). Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. *FEMS Microbiology* **268**, 1–8
- Reyes L. F., Villarreal J. E. & Cisneros-Zevallos L.** (2006). The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. *Food Chemistry* **101**, 1254-1262.
- Salinas, J. & Verhoeff, K.** (1995). Microscopical studies of the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* **101**, 377-386.
- Salunkhe D. K., Bolin H. R. & Reddy N. R.,** (1991). Storage, processing, and nutritional quality of fruits and vegetables. Vol 2. CRC PRESS. EE.UU.
- Savatin D. V., Gramegna G., Modesti V. & Cervone F.** (2014). Wounding in the plant tissue: the defense of a dangerous passage. *Frontiers in Plant Science* **5**, 470.
- Serrano M., Coluccia F., Torres M., L' Haridon F. & Métraux J.-P.** (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science*. **5**, 274.
- Singleton V.L. & Rossi J.A.** (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**: 144-158.
- Sommer N. F.** (1982). Postharvest handling practices and postharvest diseases of fruits. *Plant Disease* **66**, 357–363
- Starret D. A. & Laties G. C.** (1993). Ethylene and wound-induced gene expression in the preclimacteric phase of ripening avocado fruit and mesocarp discs. *Plant Physiology* **103**, 227-234.
- van der Vlugt-Bergmans, C. J. , Wagemakers, C. A. & van Kan, J. A.** (1997). Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 21-29.
- van Kan J. A.** (2005). Infection Strategies of *Botrytis cinerea*. *Proc. VIIIth IS Postharvest Phys. Ornamentals*.
- van Kan J. A.** (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* **11**, 247–253.
- Williamson B., Duncan G. H., Harrison J. G., Harding L. A., Elad Y. & Zimand G.** (1995). Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **99**. 1303–1310
- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P. & van Kan J. L.** (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* **8**, 561–580.
- Young Soon K., Jung Yoon P., Kwang Sang K., Moon Kyung K., Soo Jin C. & Boung-Jun O.** (2002). A thaumatin-like gene in nonclimacteric pepper fruits used as molecular marker in probing disease resistance, ripening, and sugar accumulation. *Plant Molecular Biology* **49**, 125-135.