

Optimización de técnicas de fenotipado para la susceptibilidad/tolerancia a *Penicillium expansum* en accesiones de manzana conservadas en frío

S.R.R. Benzai¹, L. Mestre², R. Giménez¹, P. Mignard¹, C. Julián², V. González², M.A. Moreno^{1*}.

¹ Departamento de Pomología, Estación Experimental de Aula Dei, EEAD-CSIC, Avda. Montañana 1005, E-50059 Zaragoza. *mmoreno@eead.csic.es

² Sistemas Agrícolas, Forestales y Medio Ambiente, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón—IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza

Resumen

La investigación sobre la tolerancia natural de los frutos a las podredumbres de almacenamiento requiere el uso de un protocolo de cribado óptimo. El *Penicillium expansum* es un agente etiológico causante de la ‘podredumbre húmeda de corazón’ en manzanas. En este trabajo y con el objetivo de optimizar un protocolo de bioensayo para la evaluación de la susceptibilidad/tolerancia frente a *P. expansum*, se inocularon 29 accesiones de manzana de la Estación Experimental de Aula Dei. Se incubaron durante 14 días y se midió el diámetro de la lesión y el diámetro de cada fruto y se calcularon 4 nuevos parámetros de fenotipado. Se compararon los parámetros entre sí y con el diámetro de la lesión en cuanto a la estabilidad según el cultivar, la detección de efectos significativos de parámetros bioquímicos y la correlación con el diámetro del fruto. Los resultados indicaron que la profundidad calculada de la lesión era el mejor parámetro ensayado, ya que no estaba influida por el tamaño del fruto, era estable dentro de una misma accesión y resultaba en más correlaciones significativas con otros parámetros bioquímicos medidos.

Palabras clave: *Malus x domestica*, germoplasma, Moho azul, protocolo, podredumbre.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la susceptibilidad de distintas accesiones de manzano (*Malus x domestica* Borkh) a la infección por *Penicillium expansum* Link es de gran interés, no solo por las pérdidas económicas en la fase de poscosecha, sino también por el peligro para la salud humana, dadas las toxinas secretadas por el hongo. La búsqueda y explotación de fuentes naturales de tolerancia a *P. expansum* constituye un método natural y sostenible de protección contra el hongo. Para un bioensayo preciso, se debe tener en cuenta tres aspectos claves de este: el control de los distintos efectos que pueden influir sobre el fenotipado, la planificación del experimento y el fenotipado en sí.

En primer lugar, es imperativo disponer y cosechar todos los genotipos a evaluar en el mismo nivel de madurez, dado que el estado de madurez de los frutos influye directamente sobre la susceptibilidad a *P. expansum* (Vilanova et al., 2014). En este sentido, y para una planificación óptima del experimento, se aconseja almacenar los frutos en frío antes de inocularlos, en vez de hacerlo justo después de la cosecha. Así, nos aseguramos la obtención de más diferencias significativas entre accesiones. Este es el caso en las infecciones por *Colletotrichum fioriniae* (Marcelino & Gouli) Pennycook, que resultan más diferenciadas en los frutos almacenados durante 3 meses a 2°C que en los frutos recién cosechados (Grammen et al., 2019). También Vilanova et al. (2012)

encontraron más diferencias en cuanto a la susceptibilidad frente a *P. expansum* en manzanas almacenadas a 0°C que a 20°C. Finalmente, para un fenotipado preciso, el uso de un parámetro no influido por la forma y el tamaño del fruto es imprescindible. El parámetro más comúnmente usado es el diámetro de la lesión. No obstante, este parámetro se ve muy influido por el tamaño del fruto. Además, esta medida está siempre limitada a las lesiones que son más pequeñas que el diámetro del fruto inoculado. Este trabajo trata de poner a punto un protocolo de cribado fenotípico de resistencia al hongo, poniendo el énfasis sobre la búsqueda de parámetros de fenotipado precisos y no influidos por el tamaño del fruto.

MATERIAL Y MÉTODOS

En 2021, se cosecharon 29 accesiones de manzano del Banco de Germoplasma de la Estación Experimental de Aula Dei-CSIC (Aragón, Zaragoza) para su posterior análisis. Fueron almacenadas en una cámara fría a 1.5-2°C durante 4 meses antes de su inoculación. Las variedades fueron inoculadas mediante punción en un punto alrededor del eje central y una posterior infiltración con 5 µl de una solución conidial. La solución proviene del aclarado de un cultivo de *P. expansum* en placas y contiene 6.1×10^7 con/mL. Tras la inoculación, los frutos artificialmente infectados fueron incubados en la oscuridad durante 14 días a 25°C y con una humedad relativa (HR) de 40-60%.

El diámetro de la lesión (DL) se midió, tras dos semanas de incubación, en sectores perpendiculares (sectores longitudinales y latitudinales de los frutos cuando las lesiones no eran perfectamente circulares) con un calibre digital. También se estimó el diámetro del fruto para calcular cuatro parámetros más: la profundidad de la lesión (PL) (Ecuación (1)), el arco de la lesión (AR) (Ecuación (2)), la proporción del arco de la lesión en relación a la circunferencia del fruto (PAR) (Ecuación (3)), y finalmente la proporción entre el volumen de la lesión y el volumen del fruto (PV), que se calculó considerando la lesión como una media esfera, cuyo radio es la profundidad de lesión y considerando que la manzana es una esfera, cuyo diámetro es el de la manzana en la zona ecuatorial (Ecuación (4)) (Figuras 1 y 2). Estos parámetros se utilizaron en la determinación de la gravedad de las lesiones para la evaluación de la tolerancia/susceptibilidad de las accesiones.

$$PL = D \cdot \sin(180 - 2 \cdot (\text{Acos}(A/D))) / 4 \quad (1)$$

$$AR = D \cdot \pi \cdot ((180 - 2 \cdot (\text{Acos}(A/D))) / 360) \quad (2)$$

$$PAR = C / (D \cdot \pi) \quad (3)$$

$$PV = (\pi \cdot (D/2)^3) - ((\pi \cdot B^3) / 2) \quad (4)$$

Para evaluar la fiabilidad de cada parámetro calculado, se establecieron los siguientes criterios y se realizaron las pruebas correspondientes para evaluarlos. Así, se definió que un buen parámetro para el fenotipado debe tener y/o cumplir:

1. Correlación baja o nula con el tamaño del fruto (bajo sesgo de tamaño del fruto).
2. Baja desviación estándar normalizada entre las réplicas de una misma accesión.
3. Correlaciones significativas con varios parámetros químicos.

Tras definir el tipo de parámetros de fenotipado y la relación entre todos ellos, paralelamente se llevaron a cabo varios análisis bioquímicos de partida en los frutos no inoculados. Se analizó el contenido en fenoles totales (TPC) con el método Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), el contenido en flavonoides totales (TFC) con

el método colorimétrico especificado por Zhishen et al. (1999) y el contenido en ácido ascórbico (AsA) según Zaharieva y Abadía (2003). Además, la actividad enzimática de la Fenilalanina amonio-liasa (PAL) fue determinada con el método descrito por Tovar et al. (2002), y las actividades de la Peroxidasa (POX) y de la Polifenol oxidasa (PPO) fueron determinadas respectivamente con los métodos de Dann y Deverall (2000) y de Galeazzi et al. (1981). Finalmente, el contenido en proteínas fue determinado según Bradford (1976). Los valores del índice de madurez (IM) y del contenido en sólidos solubles (CSS) provienen de los datos de Mignard et al. (2021) sobre las mismas variedades.

El efecto de los diferentes genotipos y de los parámetros bioquímicos sobre el DL y otros parámetros fenotípicos, desarrollados en cada fruto tras la inoculación, se analizó estadísticamente mediante un análisis de correlación de Pearson. A continuación, se calculó la desviación estándar normalizada de cada parámetro de fenotipado, y se calculó la correlación de Pearson de cada parámetro con el diámetro del fruto inoculado. Todos los análisis estadísticos se hicieron mediante el lenguaje R (v.4.2.0) (R Core Development Team, 2019).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de los distintos parámetros fenotípicos observados según los tres criterios (número de correlaciones significativas con parámetros bioquímicos, estabilidad e independencia del tamaño del fruto) queda recogida en la Tabla 1. El análisis mostró que varios parámetros bioquímicos mostraron un efecto significativo sobre los parámetros fenotípicos medidos. Las correlaciones de Pearson entre los parámetros de fenotipado y los parámetros bioquímicos cuantificados se presentan en la Tabla 2. Los análisis mostraron que la profundidad de la lesión (PV) y la proporción del arco de la lesión (PAR) solo presentaron una correlación significativa con solo uno de los parámetros bioquímicos analizados. Así, la PAR se correlacionó con el ácido ascórbico ($r=0,45$) y la PV con el contenido en proteínas ($r=0,39$). El arco de lesión (AR) y el diámetro de la lesión (DL) mostraron dos correlaciones significativas, pero no con los mismos parámetros: el DL con la actividad de la PPO ($r=-0,42$) y con el contenido en sólidos solubles (CSS) ($r=-0,4$), y el AR con la actividad de la PPO ($r=-0,4$) y con el AsA ($r=0,37$). Finalmente, la profundidad de la lesión (PL) se correlacionó significativamente con tres parámetros bioquímicos: la actividad de la PPO ($r=-0,42$), el CSS ($r=-0,38$) y el IM ($r=-0,36$). La desviación estándar normalizada del DL, de la PL y del AR fueron respectivamente de 4,1%, 5,59% y 6,61%, lo que es aceptable. Por otra parte, la PAR y la PV mostraron una alta variación según el cultivar, con valores de 9,26% y 13,05% respectivamente. En cuanto a la correlación con el tamaño del fruto, el DL, la PAR y la PV, mostraron una correlación altamente significativa (DL $r=0,73$; PAR $r=-0,49$; PV $r=-0,52$). Sin embargo, el AR y la PL no se correlacionaban con el diámetro del fruto, lo que les convierte en parámetros independientes del tamaño del fruto, y por ello, en mejores parámetros.

CONCLUSIONES

Tras el análisis de los resultados obtenidos, se concluyó que la profundidad de lesión (PL) y el arco (AR) de ésta fueron parámetros no influidos por el diámetro del fruto, al contrario que el diámetro de la lesión. Además, fueron bastante estables dentro de las distintas accesiones inoculadas artificialmente. El arco de la lesión no mostró una correlación significativa con el contenido en sólidos solubles (CSS), al contrario que el diámetro de la lesión y su profundidad. Sin embargo, el arco de la lesión (AR) fue el

único de los parámetros no influidos por el tamaño del fruto y además se correlacionó con el ácido ascórbico (AsA). Finalmente, la profundidad de la lesión resultó significativamente correlacionada con los mismos parámetros que el diámetro de la lesión (la actividad de la PPO y el CSS) y con un parámetro más (el índice de madurez). Por todo ello se propone la profundidad de lesión calculada como parámetro de fenotipado alternativo al diámetro de la lesión, y el arco de la lesión como complemento para poder permitir un mejor fenotipado en futuros trabajos de evaluación de susceptibilidad/tolerancia frente a *P. expansum*.

REFERENCIAS

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Dann, E.K., y Deverall, B. J. (2000). Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. *Plant Pathology*, 49(3), 324–332. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00457.x>
- Galeazzi, M.A.M., Sgarbieri, V. C., y Constantinides, S. M. (1981). Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenoloxidases (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii*, L). *Journal of Food Science*, 46(1), 150–155. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb14551.x>
- Grammen, A., Van Campenhout, J., Geeraerd, A., y Keulemans, W. (2019). Susceptibility of apple fruits (*Malus x domestica* Borkh.) to the postharvest pathogen *Colletotrichum fioriniae*: cultivar differences and correlation with fruit ripening characteristics. *European Journal of Plant Pathology / European Foundation for Plant Pathology*, 155(3), 801–816. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01812-0>
- Mignard, P., Beguería, S., Reig, G., Font i Forcada, C., y Moreno, M. A. (2021). Genetic origin and climate determine fruit quality and antioxidant traits on apple (*Malus x domestica* Borkh). *Scientia Horticulturae*, 285, 110142.
- Singleton, V.L., y Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Tovar, M.J., Romero, M.P., Girona, J., y Motilva, M. J. (2002). L-Phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea* L cv Arbequina) fruit grown under different irrigation regimes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(8), 892–898.
- Vilanova, L., Wisniewski, M., Norelli, J., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Phillips, J., Droby, S., y Teixidó, N. (2014). Transcriptomic Profiling of Apple in Response to Inoculation with a Pathogen (*Penicillium expansum*) and a Non-pathogen (*Penicillium digitatum*). *Plant Molecular Biology Reporter / ISPMB*, 32(2), 566–583.
- Zaharieva, T. B., y Abadía, J. (2003). Iron deficiency enhances the levels of ascorbate, glutathione, and related enzymes in sugar beet roots. *Protoplasma*, 221(3-4), 269–275.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., y Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

TABLAS

Tabla 1. Resumen de la evaluación de cada parámetro de fenotipado.

Parámetro	DL	AR	PAR	PV	PL
N	2	2	1	1	3
Coefficiente de variación	4,10%	6,61%	9,26%	13,05%	5,59%
Correlación con el diámetro del fruto	0,73***	ns	-0,49**	-0,52**	ns

Estadísticamente significativo a *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$ y ns, no significativo. Abreviaciones: N, número de correlaciones significativas con parámetros bioquímicos, DL, diámetro de la lesión, AR, arco de la lesión, PAR, proporción del arco de la lesión sobre la circunferencia del fruto, PV, proporción del volumen de la lesión sobre el volumen del fruto, PL, profundidad de la lesión

Tabla 2. Correlaciones de Pearson entre parámetros fenotípicos y bioquímicos para las 29 accesiones de manzana evaluadas.

Parámetros	DL	AR	PAR	PV	PL
TPC (mg GAE.g-1 PS)	- 0,068	- 0,041	0,033	0,077	- 0,038
TFC (μg CAT.g-1 PS)	- 0,10	- 0,02	0,1	0,15	- 0,03
AsA (μg AsA.g-1 PS)	0,054	0,370*	0,454**	0,358	0,204
Proteínas (mg.g-1 PS)	0,109	0,242	0,324	0,392*	0,249
PAL (U.g-1 proteína)	0,045	- 0,084	- 0,252	- 0,351	- 0,082
POX (U.g-1 proteína)	- 0,013	- 0,173	- 0,232	- 0,217	- 0,114
PPO (U.g-1 proteína)	- 0,421*	- 0,401*	- 0,192	- 0,148	- 0,426*
IM (Mignard et al., 2021)	- 0,28	- 0,29	- 0,22	- 0,29	- 0,36*
CSS ($^{\circ}\text{Brix}$)(Mignard et al., 2021)	- 0,40*	- 0,31	- 0,11	- 0,14	- 0,38*

Estadísticamente significativo a *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$ y ns, no significativo. Abreviaciones: DL, Diámetro de la lesión, AR, Arco de la lesión, PAR, Proporción del arco de la lesión sobre la circunferencia del fruto, PV, Proporción del volumen de la lesión sobre el volumen del fruto, PL, Profundidad de la lesión, TFC, Contenido en Fenoles Totales; GAE, Equivalente de ácido gálico; PS, Peso seco; TFC, Contenido en Flavonoides Totales; CAT, Catequina; AsA, Ácido ascórbico; PAL, Fenilalanina amonio liasa; U, Unidades de actividad enzimática; POX, Peroxidasas; PPO, Polifenol Oxidasa; IM, Índice de madurez; CSS, Contenido en Sólidos Solubles.

FIGURAS

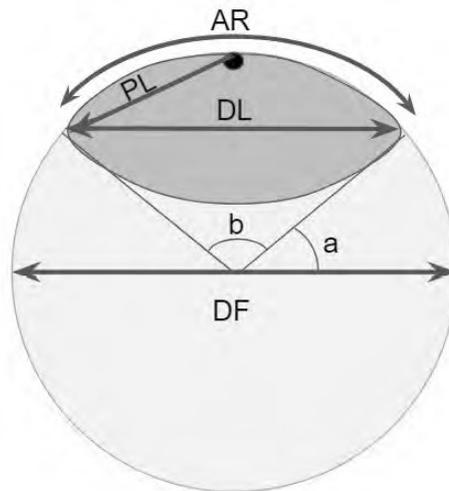


Figura 1. Representación de los parámetros de fenotipado medidos en un corte latitudinal de manzana: DL= diámetro de la lesión, PL= profundidad de la lesión, AR= arco de la lesión, DF= diámetro del fruto.



Figura 2. Corte longitudinal de una manzana inoculada artificialmente con *P. expansum* tras 14 días de incubación.