

Tesis de grado
Licenciatura en Bioquímica – Facultad de Ciencias

Defensinas de plantas nativas: fungicidas naturales para el control de patógenos de manzana

Rodrigo Becco

Tutora: Dra. Mariana Barraco Vega
Cotutora: Dra. Eloísa Arrarte

Laboratorio de Microbiología Molecular
Facultad de Química – Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Agradecimientos

Quisiera agradecerles a todas las personas que me acompañaron en este largo camino, y algunas de ellas, aunque se hayan integrado más tarde que otras supieron demostrar y dar el apoyo como si hubieran estado el primer día.

Quiero agradecer a mi familia por haberme apoyado en mis estudios destacando a mi hermana quien me ayudo a estudiar, prepararme para todo lo que venía, y siempre fue como una segunda madre para mí.

Quisiera agradecer a mis tutoras Mariana y Eloisa por la tolerancia y gran apoyo que me dieron.

A Roberto Castro que siempre estuvo mano a mano conmigo en este trabajo .

A mis amigos Ignacio, Fernanda y Vale que siempre me aguantaron la cabeza estudiando juntos, mis berrinches y mis sacadas de quicio.

A Juanchi y Seba que siempre me tiraban para adelante cuando no tenía ganas de seguir .

Por ultimo y no por eso menos importante a Vane que desde que está a mi lado, cuando me descarriaba del camino por ponerme negado con todo era la que me lograba hacer volver e insistir con esa paciencia y cariño que me tiene.

A todos ellos gracias

Índice

1. Resumen	5
2. Introducción	6
2.1 Producción de manzanas en Uruguay	6
2.2 Factores claves en la cosecha y poscosecha de manzanas	7
2.3 Factores que afectan la producción y la conservación	8
2.4 Control de patógenos en poscosecha	12
2.4.1 Agroquímicos	12
2.4.2 Biocontrol	13
2.5 Defensinas	14
3. Objetivos	18
3.1 Objetivo General	18
3.2 Objetivo Específicos	18
4. Estrategia	19
5. Materiales y métodos	21
5.1 Medios y reactivos	21
5.2 Cepas	21
5.3 Obtención de las defensinas recombinantes	23
5.3.1 Expresión de la proteína de fusión recombinante	23
5.3.2 Lisis celular	23
5.3.3 Purificación de las proteínas de fusión	24
5.3.4 Diálisis	25
5.3.5 Digestión	25
5.3.6 Purificación de las defensinas	25
5.3.7 Electroforesis	26
5.3.8 Cuantificación de proteínas	26
5.4 Ensayo de actividad antifúngico de los extractos	27
5.5 Determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las proteínas de fusión y defensinas purificadas seleccionadas	28
5.6 Ensayo en manzanas	29
5.6.1 Verificación de patogenicidad de las cepas de hongos empleadas	29
5.6.2 Ensayo de control de crecimiento fúngico en manzanas almacenadas en cámara fría	29
6. Resultados	31
6.1 Extractos sin purificar	31
6.1.1 Producción	31
6.1.2 Screening de actividad antifúngica de los extractos	32
6.2 Defensinas purificadas	34
6.2.1 Producción y purificación	34
6.2.2 Determinación de actividad antifúngica de las proteínas de fusión y defensinas purificadas	36
6.3 Ensayos en manzanas	38

6.3.1	Prueba de patogenicidad de las cepas de hongos utilizadas.....	38
6.3.2	Evaluación de la capacidad inhibitoria de las defensinas frente a la acción de <i>B. cinerea</i> en manzanas	39
6.3.3	Evaluación de control de <i>P. expansum</i> en manzanas	44
7.	Discusión	46
8.	Conclusiones	48
9.	Perspectivas	50
10.	Bibliografía.....	51
11.	Anexo 1.....	54
11.1	Medios y reactivos.....	54
11.1.1	Medios	54
11.1.2	Soluciones Stocks	54
12.	Anexo 2.....	58
12.1	Primer ensayo (a 10 °C).....	58
12.1.1	P11	58
12.1.2	M4.....	61
12.2	Ensayo en manzanas.....	64
12.2.1	Botrytis cinerea.....	64
Defensinas.....	64
Extractos.....	68
12.2.2	Penicillium expansum.....	71
Extractos.....	71
13.	Anexo 3.....	74
13.1	Screening.....	74
13.1.1	Botrytis cinerea.....	74
Resultados de % de inhibición.....	74
Resultados de Observación directa (i= inhibio, N.I= no inhibio).....	75
13.1.2	Penicillium expansum.....	76
Resultados de % de inhibición.....	76
Resultados de Observación directa (i= inhibio, N.I= no inhibio).....	76
13.2	Concentración inhibitoria Mínima (MIC)	78
13.2.1	Botrytis cinerea.....	78
13.2.2	Penicillium expansum.....	79

1. Resumen

Las enfermedades fúngicas afectan tanto la calidad como la vida útil de las frutas, ya sea en pre o poscosecha. Durante años, se han desarrollado diversos fungicidas de origen químico, los cuales pueden provocar efectos secundarios como la contaminación del suelo o intoxicaciones en los consumidores. Por esta razón, su uso requiere períodos de espera antes del consumo. Sin embargo, estos productos no garantizan una efectividad del 100% de actividad fungicida. Actualmente, se buscan alternativas más sustentables, que no perjudiquen ni al suelo ni al consumidor, y que aun así presenten una eficacia adecuada frente a la infección fúngica. En este contexto, se han propuesto distintas estrategias de biocontrol, utilizando microorganismos o componentes celulares como metabolitos secundarios y péptidos antimicrobianos. Dentro de la variedad existente de péptidos antimicrobianos las defensinas son la más estudiadas. En este trabajo se evalúa la capacidad antifúngica de defensinas obtenidas de forma recombinante y del extracto celular (fracción soluble obtenido luego de la lisis celular) de los genes proveniente de árboles autóctonos uruguayos: *Peltophorum dubium* (ibitapitá), *Erythrina crista-galli* (ceibo) y *Maytenus ilicifolia* (congorosa). Se desarrollaron ensayos *in vitro* (screening y concentración inhibitoria mínima) y ensayos *in vivo* en manzanas Red Delicious en condiciones de poscosecha. En este último ensayo se evaluó la severidad e incidencia de la infección causada por *Penicillium expansum* y *Boltrytis cinerea*, tanto en presencia como ausencia de distintas concentraciones de defensina purificada o fracción soluble de la producción recombinante. Del screening realizado, cuatro defensinas presentaron mejor grado de inhibición frente a los patógenos estudiados, de esas, dos (P11 y M4) fueron las profundizadas en este trabajo. En los ensayos frente a la infección con *P. expansum* no se observó una disminución significativa de la severidad ni de la incidencia. En cambio, en los ensayos realizados en manzanas con *B. cinerea* se obtuvieron resultados positivos con el extracto de M4 y con P11 en una concentración de 6 μM , observándose una reducción tanto en la severidad como en la incidencia de la enfermedad.

Palabras claves: Fungicida, Defensina, Manzanas, Severidad, Incidencia

2. Introducción

2.1 *Producción de manzanas en Uruguay*

A lo largo del tiempo, la actividad agraria ha sido uno de los pilares fundamentales, no solo para el auto-sustento sino también para el comercio en el mundo. Dentro de esta actividad se identifica un sector encargado de la fruta, denominado frutícola.

En Uruguay, este sector cuenta con una superficie de aproximadamente 27.000 hectáreas (ha). Según datos del anuario estadístico agropecuario del año 2024 obtenido en la web, de ese total, 3.755 ha están destinadas a la producción de cultivo de frutas de hojas caduca (manzana, pera, durazno y uva) con una producción total de 57.498 toneladas de frutos. Dentro de este grupo, la manzana es el cultivo con mayor superficie cultivada (1.894 ha), lo que representa el 55,5% del total de frutos cosechados [1].

La manzana es obtenida a partir del árbol *Malus domestica* (popularmente conocido como manzano), perteneciente a la familia de las *Rosaceas*. Se estima que existen más de 7.000 variedades distintas de manzanas. En cuanto a su consumo fresco, las más consumidas son las Fuji, Red Delicious, Gala y Granny Smith. En Uruguay se cultivan al menos seis variedades (Pink, Fuji, Gala, Genérico, Granny Smith y Red Delicious), siendo la Red Delicious la que posee mayor superficie de producción (65,9 %) en comparación a las otras, con un rendimiento de 13,6 toneladas por hectáreas, siendo cosechada en el período de febrero a marzo [1]. En el último informe del instituto nacional de estadística, disponible en la web con datos del año 2023, la producción de manzanas fue de 31.923 toneladas y se exportó un 2,6% de la producción total [1]

El 97,4% de la producción se destina a consumo interno (procesos industriales y consumo fresco), existiendo una demanda casi constante durante todo el año. Para satisfacer esta

necesidad anual, se hace sumamente importante atender los factores que aseguren la mayor durabilidad posible durante las etapas de cosecha, transporte y poscosecha [2]

2.2 Factores claves en la cosecha y poscosecha de manzanas

Las frutas atraviesan distintas etapas a lo largo de su ciclo de vida. En el caso de las frutas: crecimiento, maduración (se puede dividir en fisiológica y organoléptica), ablandamiento y senescencia. Dichas etapas están reguladas por cambios bioquímicos y fisiológicos. El crecimiento y la maduración del tipo fisiológico se llevan a cabo en el árbol, mientras que la organoléptica puede ser tanto en el árbol como luego de cosechada.

Para asegurar una mayor durabilidad de la fruta, se recomiendan ciertas prácticas durante la cosecha. Entre ellas, se destacan: no recolectar volúmenes superiores a los que pueden ser acondicionados en el mismo día; minimizar el tiempo entre la cosecha y el transporte al lugar de destino; utilizar recipientes adecuados para el traslado, tanto dentro como fuera del establecimiento (estos deben estar limpios, ser de uso exclusivo para este fin, fabricados con materiales lisos, no absorbentes y resistentes a la corrosión); evitar golpes, presiones o roces innecesarios; y emplear medios de transporte apropiados que prevengan daños como heridas, magulladuras o golpes en las frutas [3]. A su vez, existen reglamentos vigentes para el acondicionamiento de las cosechas, puntualmente en el caso de las manzanas, el decreto 161/97 del Mercosur [3-5].

Una vez cosechadas, las frutas son llevadas a su destino dónde reciben un tratamiento denominado conservación poscosecha.

La maduración organoléptica que puede darse fuera del árbol, es decir en condiciones de poscosecha, consiste en una serie de procesos que mejoran la fruta para el consumo humano. Estos procesos involucran el ablandamiento de la fruta por alteraciones en las paredes celulares, cambios de color, de acidez y aumento en la concentración de azúcares.

En conjunto logran una modificación en el sabor y olor, debido a los distintos procesos metabólicos que suceden [6-8]

En base a datos sobre su maduración obtenidos a partir de muestras tomadas semanas antes de la cosecha, se determina cual será el día que se realizará la cosecha. Luego para la conservación de esta dependerá cuál será su destino final, en el caso de que el consumo sea a la brevedad los requerimientos son : conservarla en un ambiente con alto porcentaje de humedad (humedad relativa en un 90-95 %) , a una temperatura de 0 °C y sin un control de la atmósfera. En cambio, para conservar la fruta durante períodos superiores a 4 meses, se requieren cuidados adicionales como aplicación de anti fungicos, el uso de atmósfera controladas con gases ($[O_2]= 1-2 \%$ y $[CO_2]= 1,5 – 3 \%$, en el caso de manzanas Red Delicious) y una cuidadosa selección de los frutos destinados a almacenamiento (sin heridas ni presencia de microorganismos). Bajo estas condiciones, la durabilidad puede superar los 8 meses [3-5].

2.3 Factores que afectan la producción y la conservación

En Uruguay, En el trabajo de Mondino et al (2003) [9] basado en una evaluación realizada por E.G. Falchi en el 2001 que mostró que en el tramo precosecha – consumidor, puede haber una pérdida de hasta un 54 % de la producción de manzanas. Los factores que pueden causarlo son de carácter diverso, pudiendo aparecer durante la pre o poscosecha. En general, debido a la degradación de los tejidos, ya sea por desórdenes nutricionales (por ejemplo, falta de nutrientes), temperatura o respiración. También afectan la calidad de la fruta el daño físico, químico o deterioros causados por microorganismos patógenos [9].

Cuando hablamos de enfermedades que afectan frutas en etapa de poscosecha, se pueden diferenciar dos grandes grupos: latentes o a partir de heridas, dependiendo del tipo de microorganismo implicado [9].

Las enfermedades de tipo latente son aquellas donde la fruta es infectada en una etapa de vida anterior, por ejemplo, en la flor, y se desarrolla cuando el fruto está completamente formado, un ejemplo de este tipo de enfermedad es “el corazón mohoso” causada por el hongo filamentoso *Alternaria* sp. El segundo tipo de enfermedad implica patógenos que pueden considerarse como oportunistas ya que dependen de que haya debilidad en el tejido de la fruta, o una herida causada de forma natural, donde puedan proliferar, dadas las condiciones favorables para su crecimiento [9].

Las plantas comparten el ambiente con distintos microorganismos, pero esto no significa que todos ellos sean potenciales patógenos, sino que hay algunos que viven en distintos estados de simbiosis con ellas. De todos los microorganismos con los que tienen contacto, solo algunos se comportan como potenciales agentes patógenos. Normalmente, para que se desarrolle una enfermedad deben darse una serie de interacciones entre el patógeno y el hospedero en un ambiente favorable [9].

En particular, en la producción de manzanas, los hongos filamentosos producen una pérdida aproximada de entre el 10 % y el 40 %, siendo *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* los que presenta el mayor índice reportado en poscocecha [10].

P. expansum es el agente causal de la enfermedad conocida como el Moho Azul, Esta se caracteriza por la aparición de manchas marrones claras y acuosas con bordes definidos. En caso de alta humedad, se observa además el desarrollo de conidia de color azul verdoso (Figura 1) lo que origina al nombre de la enfermedad [9]. Estas estructuras corresponden a órganos especializadas en la producción de esporas asexuales (conidios) en hongos filamentosos [11].

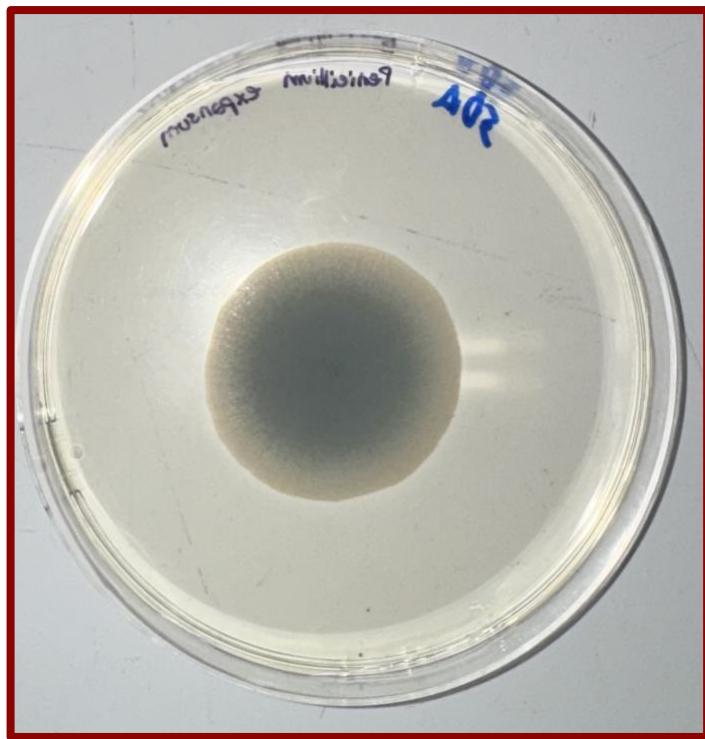


Figura 1: Crecimiento de *P. expansum* en placas con medio Potato Dextrose Agar (PDA).

P. expansum pertenece al filo Ascomycota, desde el punto de vista ecológico, se caracterizan por un estilo de vida mayoritariamente saprofítico, basado en la secreción de enzimas extracelulares que degradan polísacaridos complejos. Sin embargo, algunas cepas desarrollan un comportamiento parasítico oportunista en productos vegetales, esto quiere decir que su infección depende de la presencia de aberturas en el tejido del fruto, ya sea naturales (lenticelas) o provocadas por una manipulación inadecuada [10], [12]. Además de causar podredumbre, este patógeno puede producir patulina (micotoxina). Si bien los procesos industriales, como la pasteurización de jugos, eliminan al hongo, la micotoxina persiste y puede encontrarse en productos derivados de la fruta, como jugos y postres. Estudios realizados en Francia, Alemania y el Reino Unido reportaron concentraciones de patulina entre 5 y 626 µg/kg en subproductos de manzana, niveles significativos que representan un posible riesgo para la salud [9].

Al igual que *P. expansum*, el hongo filamentoso *B. cinerea* pertenece al filo Ascomycota, este es un hongo fitopatógeno necrotrófico. Su ciclo de vida incluye un estadío parasitario sobre los tejidos vegetales vivos, donde por medio de enzimas y moléculas efectoras que inducen la muerte celular programada del hospedero tras la necrosis adopta un estilo saprofítico, aprovechando los nutrientes liberados por el tejido senescente o muerto[13]. Sus conidias, de color gris oscuro, son responsables del nombre de la enfermedad conocida como Moho Gris (Figura 2). En manzanas infectadas, los síntomas se inician con podredumbre de color marrón claro, firme y sin bordes definidos, que progresó rápidamente. Con el avance de la enfermedad, el tejido afectado adquiere un tono más oscuro, manteniendo bordes claros, y puede llegar a abarcar todo el fruto, dándole el aspecto de una “manzana asada”. En condiciones de alta humedad, es posible observar el micelio y la abundante esporulación gris que caracteriza a este patógeno [9].

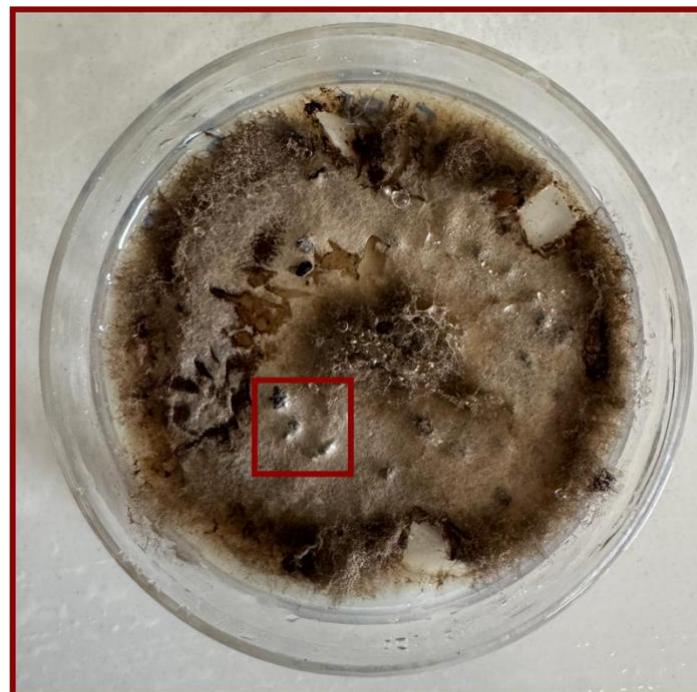


Figura 2: Crecimiento de *B. cinerea* en placa con medio PDA durante 7 días a 25 °C. En el recuadro rojo se aprecian esclerotos (estructuras de resistencia).

Estos hongos pueden dispersarse tanto por aire como por agua. En poscosecha, la infección suele ocurrir durante el lavado de los frutos, ya que las frutas lavadas después de estar en contacto con agua que contenía conidias pueden contaminarse fácilmente. La temperatura óptima de crecimiento de estos patógenos se encuentra entre 20 y 28 °C, aunque también pueden desarrollarse, de forma más lenta, a temperaturas más bajas, como las que se registran en las cámaras de refrigeración utilizadas para almacenar manzanas [9].

2.4 Control de patógenos en poscosecha

Los principales tratamientos utilizados para el control en poscosecha son de origen químico [4-5].

2.4.1 Agroquímicos.

Los agroquímicos son sustancias químicas utilizadas con fines agrarios, para mejorar o proteger las cosechas, durante el crecimiento de la fruta y en condiciones de poscosecha. Estos están regulados por los gobiernos de cada país, en Uruguay por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP).

Pueden dividirse en fertilizantes, los cuales apuntan a una mejora en la producción, y en pesticidas, que son utilizados para controles de plagas y de agentes patógenos, dependiendo lo que se quiera controlar. Por ejemplo, los insecticidas apuntan al control de plagas por insectos, mientras que los antifúngicos están dirigidos al control de hongos.

En Uruguay los productos destinados a la protección directa de los frutos deben ser utilizados únicamente si están aprobados por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), dando prioridad a aquellos que no dejan residuos tóxicos para la salud humana. La aplicación de antifúngicos es el método más utilizado, una vez recolectadas y

antes de ser almacenadas estas se rocían ya sea por aspersión o en forma de neblina dirigida entre otras y si bien han demostrado ser efectivos, se reconoce cierto grado de toxicidad para las personas y el medio ambiente [14-20]

Los antifúngicos más utilizados en Uruguay en cultivos frutales son Iprodione, Imazalil y Captan [3-5]. El Iprodione el cual es una *3-(3,5-diclorofenil)-N-(1-metiletil)-2,4-dioxo-1-imidazolidinacarboxamida* puede causar distintos efectos en la salud humana como alteraciones en el sistema endocrino y en la maduración sexual masculina. Además, es altamente tóxico para los animales marinos, y su degradación forma 3,5-dicloroanilina un compuesto persistente y potencialmente nocivo [14-16]. El Imazalil compuesto por 1-[2-(2,4-diclorofenil)-2-(2-propen-1-iloxi)etil]imidazol, es un compuesto que puede causar efectos cancerígenos en humanos ,y actúa además como disruptor endocrino, afectando la actividad hormonal. Además, puede provocar alteraciones en la microbiota intestinal. En el medioambiente resulta perjudicial para la fauna acuática y puede causar efectos adversos a largo plazo [17-19]. En el caso de Captan cuyo nombre IUPAC es *N-(triclorometiltio)-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida*, se considera menos perjudicial, pero puede causar irritación cutánea y ocular en los humanos, se degrada rápidamente en el suelo, sin embargo, en caso de alcanzar cuerpos de agua puede afectar a la fauna acuática resultando toxic para ellos [20].

El uso excesivo de antifúngicos también a dado lugar a cepas resistentes, lo que representa un riesgo potencial a futuro [9].

2.4.2 *Biocontrol*

En los ecosistemas donde habitan las plantas, los microorganismos interactúan con ellas de diversas maneras, estableciendo relaciones que van desde el comensalismo hasta el parasitismo (el cual puede o no causar daño) o el mutualismo, en el que ambas partes se benefician. Algunos de estos microorganismos actúan de manera antagonista frente a agentes patógenos, proporcionando un biocontrol natural. Mondino et al (2006)[10]

mencionan distintas definiciones de control biológico, siendo la más reciente lo mencionado por Wilson y Wisniewski (1994) se refieren al control biológico como una forma que no involucre el uso de plaguicidas de síntesis química, donde explicitan 3 métodos: el uso de microorganismos antagonistas; uso de sustancias naturales o modificación de la resistencia del huésped.

Diversos estudios han demostrado el potencial del biocontrol como alternativa al uso de antifúngicos en poscosecha, analizando distintas estrategias que incluyen la utilización de microorganismos antagonistas como levaduras y bacterias, así como compuestos naturales como quitosano, enzimas y metabolitos celulares [10],[21-22]. Entre estas estrategias, los péptidos antimicrobianos (AMPs) de origen vegetal han cobrado especial interés debido a su estabilidad y especificidad frente a patógenos, tal como se ha señalado en trabajos recientes que destacan su potencial aplicación en la industria alimentaria y en la protección frente a patógenos vegetales [24-26]. Algunas aproximaciones recientes emplean enfoques de producción recombinante, como el trabajo de Huang Yining (2021)[26], quien expresó AMPs en *Pichia pastoris* para controlar *P. expansum* en peras, demostrando su eficacia antifúngica y reforzando el potencial de estas moléculas en aplicaciones agroindustriales. Los AMPs vegetales, se destacan grupos como las esnaquinas, las heveinas, las knotinas, las tioninas y, especialmente, las defensinas, ampliamente estudiadas en términos de su estructura, mecanismos de acción y actividad antifúngica frente a diversos patógenos [24],[27-29]. Estas características hacen que las defensinas constituyan un enfoque relevante para explorar nuevas estrategias de biocontrol

2.5 Defensinas

Las defensinas vegetales son péptidos antimicrobianos (AMPs) de bajo peso molecular, ricos en residuos de cisteína y estabilizados por puentes disulfuro. Se encuentran en órganos expuestos al medio ambiente, como frutos, flores, semillas y tejidos vegetativos, y

constituyen una primera línea de defensa frente a patógenos, mostrando actividad antifúngica frente a diversos microorganismos [30].

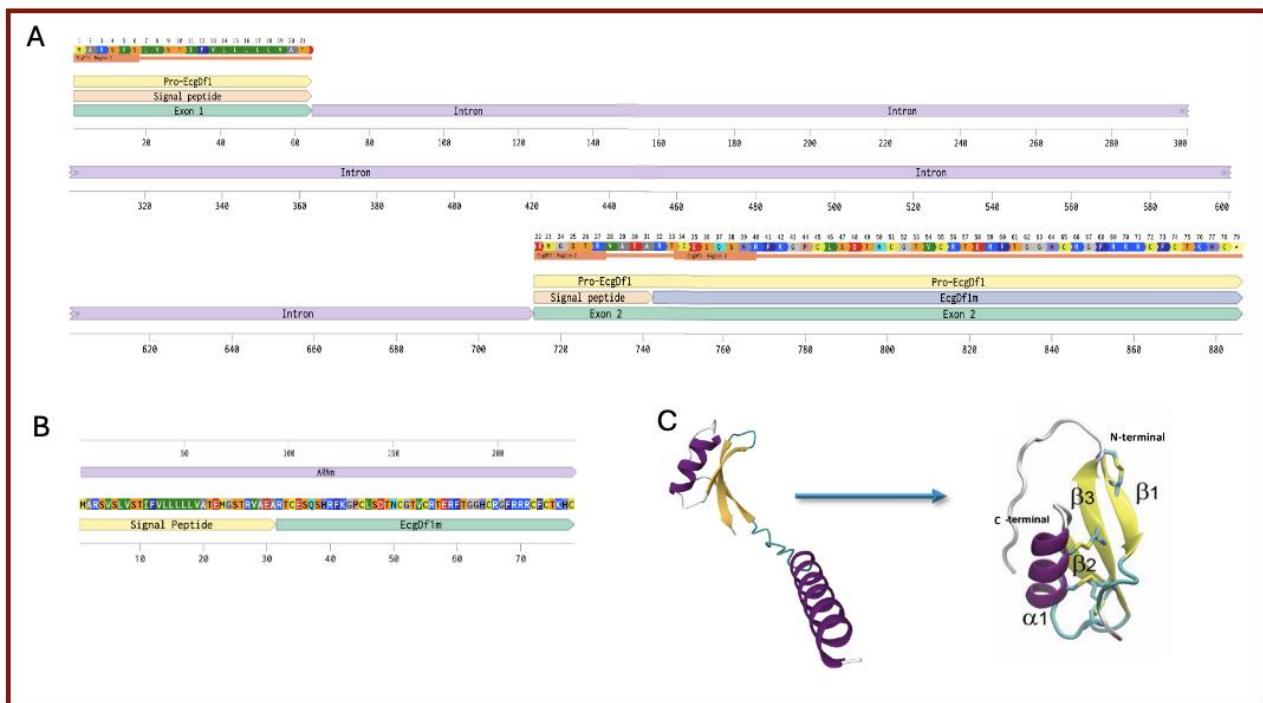


Figura 3: Esquema de la estructura génica y peptídica de la defensina de *Erytrina cris-galli* (EcgDf1) A) Esquema gen codificante para EcgDf1 , el mismo cuenta con un intrón (violeta) y dos exones (verde). B) esquema de ARNm y secuencia peptídica, con aclaración de la división del pro-péptido (amarillo y verde) y del péptido señal (amarillo). C) imagen 3D de pro-péptido (péptido señal + Defensina) y luego del efecto de clivasas se observa la Defensina madura [31].

Estructuralmente, las defensinas presentan entre 45 y 54 aminoácidos, con un peso molecular de 5 a 7 kDa y carga neta positiva. Su mecanismo de acción más estudiado implica la interacción con membranas de los patógenos, mediada por interacciones electrostáticas entre la carga positiva del péptido y la carga negativa de la membrana/pared del microorganismo, aunque también existen evidencias de efectos intracelulares. Una región crítica para la actividad antifúngica es el motivo γ -Core, altamente conservado en defensinas y otros AMPs. Este motivo está formado por dos hojas β antiparalelas conectadas por un loop, con una longitud de 8 a 18 aminoácidos y un patrón típico de GXCX₃₋₉C (figura 4). La región del loop contiene residuos básicos, hidrofóbicos y catiónicos,

esenciales para la unión a lípidos y la translocación hacia el interior del microorganismo. En algunos casos, el γ -Core por sí solo es suficiente para conferir actividad antifúngica, mientras que en otros requiere regiones adyacentes o la presencia de cofactores [24],[32-35].

Las defensinas vegetales constituyen un grupo ampliamente estudiado dentro de los AMPs debido a su estructura bien caracterizada, motivo γ -Core conservado y mecanismo de acción conocido, lo que las convierte en moléculas de interés para explorar aplicaciones en biocontrol y otras áreas biotecnológicas [24], [26-29].

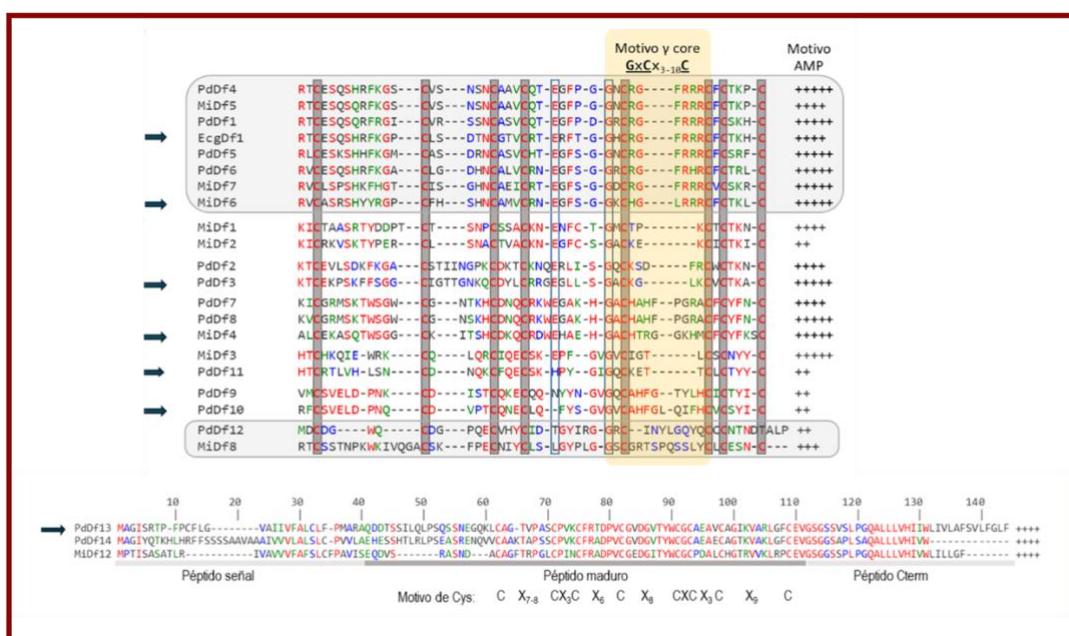


Figura 4: Alineamiento de defensinas identificadas a partir de análisis transcriptómicos de *Peltophorum dubium* (denominadas PdDfX) y *Maytenus ilicifolia* (denominadas MiDfX). Las flechas indican las defensinas utilizadas en este trabajo

En la Figura 4 se muestra el alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de diferentes defensinas vegetales. Este análisis bioinformático consiste en comparar las secuencias obtenidas y así identificar regiones conservadas que pueden estar asociadas a funciones estructurales o biológicas relevantes.

En nuestro grupo trabajo se desarrolló una base de datos de defensinas a partir de análisis transcriptómicos de tres plantas nativas: *Erythrina crista-galli* (ceibo), *Peltophorum dubium* (ibirapitá) y *Maytenus ilicifolia* (congorosa) ([31] , manuscrito en preparación). A partir de esta base de datos se seleccionaron siete genes que codifican para defensinas (flechas negras en la figura 4) para su producción recombinante en *Escherichia coli*, siendo PdDf3, PdDf10, PdDf11 (P11) y PdDf13 (P13) de *Ibirapitá*, MiDf4 (M4) y MiDf6 de *Congorosa*, y EcgDf1 (E32) de *Ceibo*. El sistema de expresión empleado permite obtener cantidades significativas de proteínas activas de forma controlada y reproducible, mediante la fusión de los genes que codifican a las defensinas a la proteína tiorredoxina (TRX) el cual “ayuda” a la defensina una vez expresada a plegarse correctamente y permanecer en el citoplasma, además de que evita la formación de agregados, estrategia ampliamente utilizada para la producción de péptidos antimicrobianos. La construcción incluye además una cola de histidinas que facilita la purificación mediante una cromatografía de afinidad debido a la formación de enlaces de coordinación entre los residuos de histidina con el metal de la fase estacionaria por ejemplo Ni^{2+} , así como un sitio de clivaje, que permite separar la proteína de interés de la secuencia de fusión.

Entre los siete genes codificantes defensinas seleccionadas se incluyeron seis con motivos estructurales típicos siendo las que contienen el motivo γ -Core conservado y una variante atípica donde difieren (PdDf13) (Figura 4). Asimismo, como parte de estos trabajos, el grupo desarrolló un método de *screening* rápido de actividad antimicrobiana basado en fracciones solubles, que posibilita evaluar la actividad de las proteínas recombinantes sin necesidad de purificación previa [36-37].

En el presente trabajo se explora por primera vez el potencial de estas defensinas recombinantes en el control de patógenos fúngicos en frutas almacenadas en cámara fría.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Evaluar el potencial de péptidos antimicrobianos de la familia de las defensinas como agentes de control de patógenos fúngicos responsable del deterioro de manzanas almacenadas en cámara fría.

3.2 Objetivo Específicos

- ❖ Evaluar cualitativamente la capacidad de inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* por parte de siete defensinas recombinantes previamente seleccionadas
- ❖ Identificar las defensinas recombinantes con mayor potencial de inhibición para su posterior purificación y caracterización cuantitativa de la actividad antifúngica.
- ❖ Verificar la patogenicidad de las cepas fúngicas seleccionadas (*Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*) mediante su inoculación en manzanas, empleando un modelo experimental previamente establecido
- ❖ Determinar la capacidad de las defensinas seleccionadas para inhibir el deterioro de manzanas Red Delicious causado por *P. expansum* y *B. cinerea* durante la conservación poscosecha en cámara fría.

4. Estrategia

La estrategia de este trabajo se centró en evaluar el potencial de defensinas recombinantes para el control de patógenos fúngicos en manzanas almacenadas en cámara fría, combinando un enfoque académico de caracterización con un enfoque aplicado orientado a la viabilidad práctica.

En primer lugar, se empleó un método de *screening* rápido previamente desarrollado, que utiliza extractos solubles de la producción de la defensina recombinante mediante lisis celular (sonicado y centrifugado) sin necesidad de purificación. Este enfoque permitió evaluar la actividad antifúngica de las defensinas de manera eficiente, ahorrando tiempo y costos, y seleccionar aquellas con mayor potencial para su posterior caracterización cuantitativa.

En paralelo, y con un enfoque menos convencional pero orientado a la aplicación práctica, se evaluó directamente la efectividad de estos extractos en manzanas. Esta aproximación apunta a explorar la viabilidad de usar los productos de lisis como agentes de biocontrol sin necesidad de purificación, lo que podría facilitar su implementación futura en condiciones de poscosecha.

Finalmente, las defensinas seleccionadas fueron purificadas y caracterizadas mediante ensayos cuantitativos y pruebas en manzanas con proteínas puras, asegurando una validación rigurosa de su actividad antifúngica y su potencial como agentes de biocontrol.

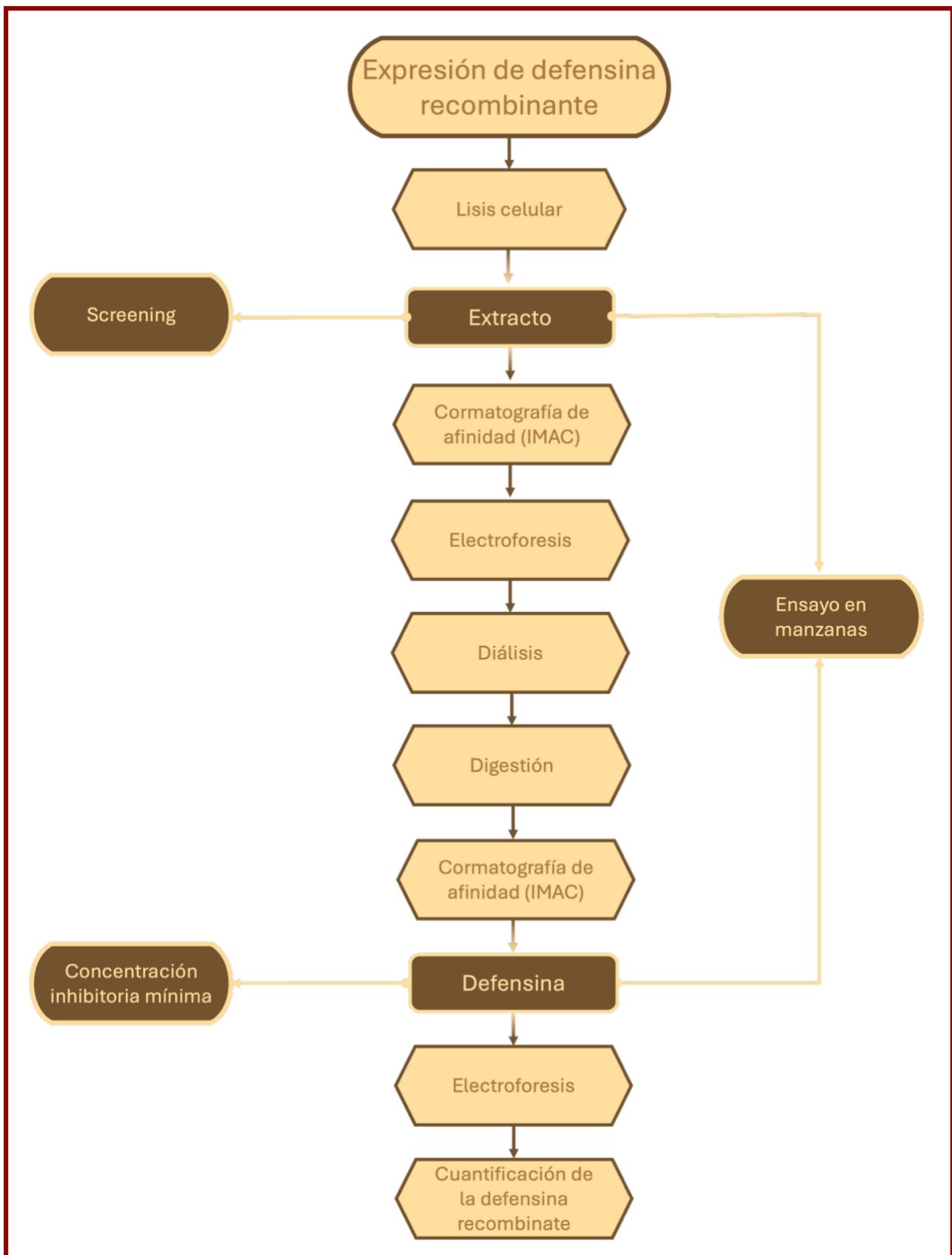


Figura 5: Esquema general de la estrategia de trabajo. Los cuadros marrones indican el producto obtenido, luego de cada etapa y las flechas beige señalan el destino de estos.

5. Materiales y métodos

5.1 Medios y reactivos

Se encuentran descriptos en el anexo 1

5.2 Cepas

Para este trabajo se utilizaron las siguientes cepas de hongos: *Botrytis cinerea* (CCMG 14s), *Penicillium expansum* (CCMG 14g), *Penicillium expansum* (cepa aislada de manzanas con síntomas de pudrición, se nombrará en el texto como Pe2M) [38].

Se trabajó con suspensiones de esporas de estos hongos, las que se prepararon empleando metodologías distintas dependiendo de la especie. Para *B. cinerea* se le agrego 1 mL de solución de tween 80 0,01% (v/v) en directamente a la placa de PDA con crecimiento del hongo y luego con una espátula estéril se realizó un raspado de manera vertical para que el tween tenga contacto con toda la superficie. Ese mismo volumen se pasó a otra placa de *B. cinerea* para obtener una suspensión más concentrada. Esta suspensión se filtró con filtro Blutex y se colocó en un eppendorff.

En el caso de *P. expansum* se realizó una toma por picadura, a partir de un palillo estéril. Se picó sobre la colonia de la placa de PDA y el mismo se resuspendió en 1 mL de solución de tween 80 al 0,01% (v/v) para facilitar la dispersión de las esporas, luego este se filtró mediante Blutex estéril y se recolecta en un eppendorff.

Luego se realizó el conteo de esporas en cámara de Thomas.

Las cepas de células transformadas de *Escherichia coli* que se utilizaron en este trabajo se obtuvieron en marco de la tesis de Doctorado de Roberto Castro Rosas mediante transformación de la cepa Rosetta-gami (DE3), (genotipo Δ (ara-leu)7697 Δ lacX74 Δ phoA

Pvull phoR araD139 ahpC galE galK rpsL(DE3) F'[lac+ lacIq pro] gor522::Tn10 trxR pRARE2 (CamR, StrR, TetR)) con los plasmidos que se detallan en la tabla 1

Tabla 1 Cepas transformadas de *E.coli* Rosetta-gami (DE3) empleadas

Plasmido	Proteína fusión recombinante	Defensina recombinante	Abreviación defensina purificada
pET32-PdDf3-Tiorredoxina	PdDf3-Tiorredoxina	PdDf3	P3
pET32-PdDf10-Tiorredoxina	PdDf10-Tiorredoxina	PdDf10	P10
pET32-PdDf11-Tiorredoxina	PdDf11-Tiorredoxina	PdDf11	P11
pET32-PdDf13-Tiorredoxina	PdDf13-Tiorredoxina	PdDf13	P13
pET32-MiDf4-Tiorredoxina	MiDf4-Tiorredoxina	MiDf4	M4
pET32-MiDf6-Tiorredoxina	MiDf6-Tiorredoxina	MiDf6	M6
pET32-EcgDf1-Tiorredoxina	EcgDf1-Tiorredoxina	EcgDf1	E32
pET32-Tiorredoxina	Tiorredoxina	-----	Control TRX

5.3 Obtención de las defensinas recombinantes

Las condiciones tanto de cultivo y de producción de las defensinas fueron optimizadas previamente en el marco de los trabajos de doctorado en desarrollo de Roberto Castro Rosas, siguiendo protocolos establecidos por el grupo de trabajo.

5.3.1 Expresión de la proteína de fusión recombinante

Las cepas de *E.coli* que contienen el vector que expresan cada una de las defensinas, se sembraron en placa con medio Luria-Bertani (LB) agar ampicilina e incubadas a 37 °C. A partir de colonias aisladas de estas placas se prepararon los pre-cultivos en 20 mL de medio LB suplementado con ampicilina (50 µg/mL), los cuales se incubaron durante 16 h a 37 °C y 150 rpm. Posteriormente, se inocularon 10 mL de pre-cultivo en matraces Erlenmeyer de 1 L conteniendo 100 mL de medio LB con ampicilina (50 µg/(mL), y se incubaron a 37 °C 150 rpm hasta obtener una densidad óptica a 600nm (DO₆₀₀) de entre 0,5 y 0,7. Alcanzado el valor de DO se agró isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) (hasta una concentración final de 2 mM final) para inducir la expresión de las defensinas. Se continua la fermentación incubándose por 24 h post-inducción a 37 °C y 150 rpm. Finalmente, los cultivos se cosecharon por centrifugación durante 15 min a 4 °C y 5000 rpm.

5.3.2 Lisis celular

Para la lisis celular se siguió el protocolo recomendado en Sambrook & Russel, 2001 [39], con algunas modificaciones.

A partir de los pellets obtenidos de los cultivos se realizó una lisis mixta. Se agregaron 10 mL de buffer de lisis (Anexo 1) y una punta de espátula de Lisozima (New England Biolabs, Cat. P8115S). Se incubó en hielo durante 30-45 min con intervalos de mezcla suave cada 5 min. Luego se procedió a la lisis física, para ello, se sonicó (Sonics and Materials, inc , Autotune Series) durante 2 min con un pulso de 2,5s ON y 9,5s OFF, una amplitud de 30% durante 8 rondas.

Una vez finalizadas las rondas de sonicado, se agregaron 14 μ L de DNAsa 5 μ g/mL , 3,5 μ L de RNAsa 5 μ g/mL y 350 μ L de Tritón 20%. Se centrifugó durante 30 min a 4 °C y 10.000 rpm y se separaron las fracciones (soluble e insoluble) guardando una alícuota de cada fracción.

La fracción insoluble se lavó con 1-5 mL de buffer de lisis (dependiendo de la masa obtenida) repitiendo las rondas de sonicado (4 en todos los casos) y centrifugando durante 30 min a 4 °C y 10.000 rpm, tomando alícuotas de las fracciones solubles obtenidas. Se realizó el perfil electroforético de las fracciones obtenidas, juntándose aquellas que tuviera la presencia de la Defensina-tiorredoxina-Histag, en la fracción soluble de los cultivos de *E.coli* en una única muestra que se denominó extracto, se liofilizo y se resuspendió en un volumen final de 3 mL de buffer de lisis y se conservó a -20 °C hasta el momento de su uso.

5.3.3 *Purificación de las proteínas de fusión*

Los extractos descongelados en hielo se purificaron mediante cromatografía de afinidad IMAC con columnas comerciales HisTrap de 5 mL siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante Cytiva.

Las muestras se cargaron en la columna previamente equilibrada con el mismo buffer de lisis utilizando una bomba peristáltica a un flujo de 1 mL/min, se realizaron lavados con 2 volúmenes columna (VC) de buffer de lisis para extraer la fracción no retenida, luego para eluir fracciones con uniones inespecíficas se eluyó con 2 VC de buffer de elución con imidazol 20 mM y con 2 VC buffer de elución con imidazol 50 mM. Posteriormente, se realizó la elución utilizando 6 VC de buffers de elución con imidazol 300 mM. Se colectaron las fracciones de 1 mL y las distintas etapas fueron controladas por mediciones de absorbancia a 210 y 280 nm y se controló por electroforesis. En las fracciones eluidas, una vez detectado el pico de absorbancia a 280 nm, se seleccionaron las fracciones cercanas a este punto (aquellas que fueran \pm 0.1 de la absorbancia del máximo) y se mezclaron, mientras que el resto de las fracciones se almacenaron por separado en freezer a -20 °C.

5.3.4 Diálisis

A las fracciones del pico de absorbancia de la elución se le realizó una dialisis con el fin de eliminar los restos de imidazol. La dialisis se realizó utilizando una membrana Pre-wetted RC Tubing MWCO 3,5 kD Fisher Sci. en buffer de dialisis Buffer Tris 20 mM, NaCl 50 mM (cambiando cada 2 h durante 8 h).

5.3.5 Digestión

Luego de obtener las muestras dializadas se procedió a digerirlas con la enzima proteolítica AcTEV siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante Invitrogen, empleando 1 μ L de la enzima comercial por cada 30 μ g de proteínas de fusión, obteniendo las estructuras que se muestran en la figura 6.

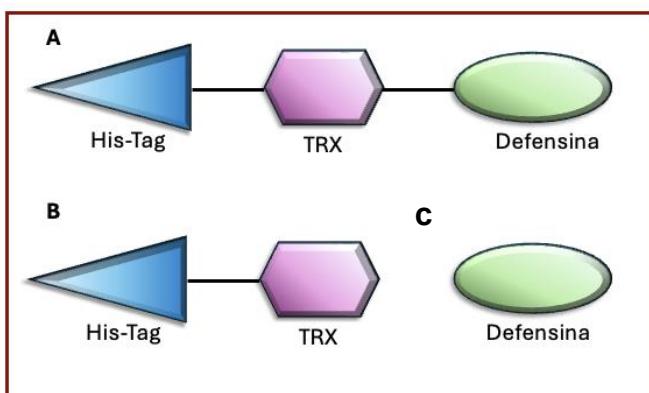


Figura 6: Esquema de los productos obtenidos que se utilizaron en este trabajo. (A) Producto correspondiente a Defensina-tiorredoxina-histag y en el caso de los extractos + contenido celular y (B) Producto correspondiente a Control TRX (C) Defensina purificada.

5.3.6 Purificación de las defensinas

A partir de las muestras digeridas se procedió a realizar una cromatografía de afinidad (IMAC) empleando columnas comerciales HisTrap de 5 mL (Cytiva). Las muestras se cargaron en las columnas y se lavaron con el mismo buffer de dialisis. En el lavado se colectaron muestras de 1,5 mL y se monitoreó midiendo la absorbancia a 210 y 280 nm, que es donde se espera obtener a la defensina.

Posteriormente, se realizaron se eluyó la fracción retenida en la matriz con buffer de elución con diferentes concentraciones de imidazol (50 mM y 500 mM).

Las fracciones correspondientes a los picos de absorción (anterior y posterior a la adición de imidazol) fueron seleccionadas para su análisis por electroforesis, mientras que las restantes se almacenaron en freezer -20 °C

5.3.7 *Electroforesis*

El control de la producción recombinante y de las distintas etapas de purificación se realizó mediante electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), utilizando un gel de poliacrilamida discontinuo, con un gel de apilamiento al 5 % y un gel de resolución al 15 %.

Las muestras se prepararon usando un volumen de la muestra y otro del buffer de carga. Posteriormente se llevaron a baño de agua a ebullición durante 5 min, se cargaron 10 µL de muestra, 5 µL de marcador de peso molecular se corrió por 30 min a 75 mV hasta que se concentrara en el gel de apilamiento y luego se corrió durante 2h a 120 mV.

Una vez finalizada la corrida electroforética, el gel fue teñido con solución de Coomassie durante 1 h con agitación a temperatura ambiente.

Posteriormente se incubó en solución de desteñido durante 40 min – 1 h hasta eliminar el exceso.

5.3.8 *Cuantificación de proteínas*

La cuantificación se realizó por el método de ácido bicinconílico (BCA) empleando un kit comercial (kit Pierce) siguiendo las instrucciones de fabricante (Thermo Fisher Scientific), donde para la realización de la curva de calibración se utilizó BSA como estándar proteico.

5.4 *Ensayo de actividad antifúngico de los extractos*

Este ensayo corresponde a una adaptación del método de microdilución en placa de 96 pocillos. La puesta a punto y validación de la técnica se realizó previamente en el marco de la tesis de doctorado de Roberto Castro Rosas, utilizando como modelo la variante de defensina EcgDf1 [36].

El ensayo de la actividad antifúngica de las defensinas se realizó utilizando los extractos obtenidos tras la lisis celular, los cuales contenían las defensinas-tiorredoxina-histag además del resto de las proteínas solubles de *E.coli*. Para los ensayos se emplearon cepas de *B.cinerea* (CCMG 14s) y *P.expansum* (Pe2M)[39].

En una placa de 96 pocillos se agregaron 60 µL de cada extracto en la primera fila. En los pocillos de las filas siguientes se colocaron 30 µL de H₂O destilada y se procedió a tomar 30µL de la primera fila y realizar diluciones seriadas al medio a lo largo de la placa hasta la última fila. Luego se agregaron 70 µL de una suspensión de esporas en medio Malt Extract Broth (MEB) alcanzando una concentración final de 1x10⁵ esporas/mL en cada pocillo. Las placas se incubaron a 28 °C durante 7 días. El mismo procedimiento se empleó para *B.cinerea* y *P. expansum*.

Se incluyeron cuatro controles: (1) Control de crecimiento (CC) contenido la suspensión de esporas en medio MEB lo que permitió confirmar la viabilidad del hongo en el medio y realizar un seguimiento diario del crecimiento para determinar la finalización del ensayo, (2) Control sin microorganismo (CSM) contenido únicamente medio MEB, utilizado para descartar contaminación, (3) Control de turbidez (Turb) contenido medio MEB y extracto de la TRX-Histag (Control TRX), empleado como blanco de absorbancia, (4) Control TRX, contenido suspensión de esporas en medio MEB y extracto de la proteína TRX-Histag, utilizado para discriminar la actividad específica de la defensina.

La actividad antifúngica se evaluó mediante observación directa del crecimiento del hongo en los pocillos que contenían los extractos de comparación con el crecimiento del control

TRX. Aquellos pocillos que presentaron menor esporulación respecto al control TRX fueron considerados como activos.

El ensayo también se siguió por medición de absorbancia a 600nm, donde se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left(100 - \left(\frac{Abs_{extractos} - Abs_{Turb}}{Abs_{CC,promedio}} \right) \right) \cdot 100$$

Una vez calculados los porcentajes de inhibición para todos los extractos, incluida la inhibición por el control TRX, se procedió a comparar estos valores. Aquellos extractos que, en su respectiva dilución, presentaban un porcentaje de inhibición superior al del control TRX fueron considerados como activos. El ensayo se realizó por triplicado.

5.5 *Determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las proteínas de fusión y defensinas purificadas seleccionadas*

Este ensayo se realizó en forma similar al anterior, pero evaluando la actividad antifúngica de las defensinas purificadas y las mismas cepas de hongos utilizada en los *screenings*.

En este ensayo, la concentración de partida de las proteínas de fusión y de las defensinas purificadas fue de 12 μM y se realizaron diluciones seriadas hasta 0,094 μM .

A diferencia del ensayo de *screening* este tuvo tres controles: (1) Control de crecimiento (CC) contenido la suspensión de esporas en medio MEB lo que permitió confirmar la viabilidad del hongo en el medio y realizar un seguimiento diario del crecimiento para determinar la finalización del ensayo, (2) Control sin microorganismo (CSM) contenido únicamente medio MEB, utilizado para descartar contaminación, en este caso también actuó como blanco de las medidas de absorbancia y (3) Control positivo (Propi) contenido suspensión de esporas en medio MEB, y propiconazol con una concentración inicial de 130 μM , actuando como control positivo frente a la inhibición de esporulación del hongo. Las

placas se evaluaron por observación directa al séptimo día y por medidas de absorbancia al tercer día.

Una vez obtenidas las medidas de absorbancia se calculó el % de inhibición a partir de la formula:

$$\% \text{ inhibición} = \left(100 - \left(\frac{Abs_{defensina} - Abs_{CSM\text{ promedio}}}{Abs_{CC,\text{ promedio}} - Abs_{CSM\text{ promedio}}} \right) \right) \cdot 100$$

A partir de los valores de inhibición se determinaron los valores concentración inhibitoria mínima (CIM) al 100% de inhibición. El ensayo se realizó por duplicado.

5.6 Ensayo en manzanas

5.6.1 Verificación de patogenicidad de las cepas de hongos empleadas

Para esta prueba se seleccionaron 6 manzanas por cada hongo evaluado. Las frutas fueron lavadas con etanol 70%, una vez secas se les realizaron cinco heridas distribuidas a lo largo de la línea ecuatorial y se inocularon con 10 μL de una suspensión 1×10^4 esporas/mL del hongo correspondiente. Luego, se incubaron en cámara a 28°C y se monitorearon diariamente hasta observar la aparición de halos de pudrición alrededor de las heridas.

El objetivo del ensayo fue confirmar la patogenicidad de las cepas de *B. cinerea* y *P. expansum* empleadas.

5.6.2 Ensayo de control de crecimiento fúngico en manzanas almacenadas en cámara fría

Para estos ensayos se utilizaron un total de 150 manzanas de la variedad Red Delicious. Fueron seleccionadas individualmente de manera que no presentaran heridas, golpes o algún tipo de daño en la piel, luego se lavaron con etanol 70% y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 5 heridas con punzón en la zona

ecuatorial de cada manzana y se le inoculó cada herida con 10 μ L de extracto o defensina (en concentración CIMx1/2, CIMx1 y CIM x2) a evaluar y 10 μ L de la suspensión de esporas (1x10⁴ esporas/mL) del hongo correspondiente [21].

Se empleo como control manzanas inoculadas únicamente con la suspensión de esporas de los hongos y para el ensayo con los extractos además se agregó como control a manzanas inoculadas con control TRX.

Se emplearon 6 manzanas por cada tratamiento ensayado , siendo 30 el total de heridas por tratamiento.

Las manzanas se incubaron en cámara entre 0 - 1 °C hasta que los controles presentara crecimiento en todas las heridas.

La evaluación de este ensayo se realizó por la determinación de la incidencia y la severidad de la enfermedad. La severidad se define como la proporción o grado con que una enfermedad, infección o daño afecta al tejido u organismo susceptible, considerando la intensidad del daño y la cantidad de área afectada [40]. Se calculó a partir de la siguiente

$$\text{ecuación : \%severidad} = \left(\frac{\text{Tamaño de la herida}}{\text{Promedio tamaño herida del control}} \right) \cdot 100.$$

La incidencia, como la proporción de heridas que presentaron síntomas visibles en relación con el total evaluado, expresada como porcentaje [40]. En este caso, se utilizó la siguiente

$$\text{fórmula: \%incidencia} = \left(\frac{\text{Nº de heridas con pudrición}}{\text{Nº total de heridas}} \right) \cdot 100.$$

A partir de estos datos se realizó un análisis estadístico mediante el test de tukey (en el contexto de ANOVA) utilizando el programa J.A.S.P. [43]

6. Resultados

6.1 Extractos sin purificar

6.1.1 Producción

Para todos los vectores de expresión se obtuvo un crecimiento acorde a lo esperado. Se realizaron los procesos de cultivo y lisis celular, la fracción soluble fue analizado mediante electroforesis (Figura 7). Esta muestra corresponde al denominado extracto, el cual contiene la defensina fusionada a TRX-HisTag junto con los restantes componentes celulares.

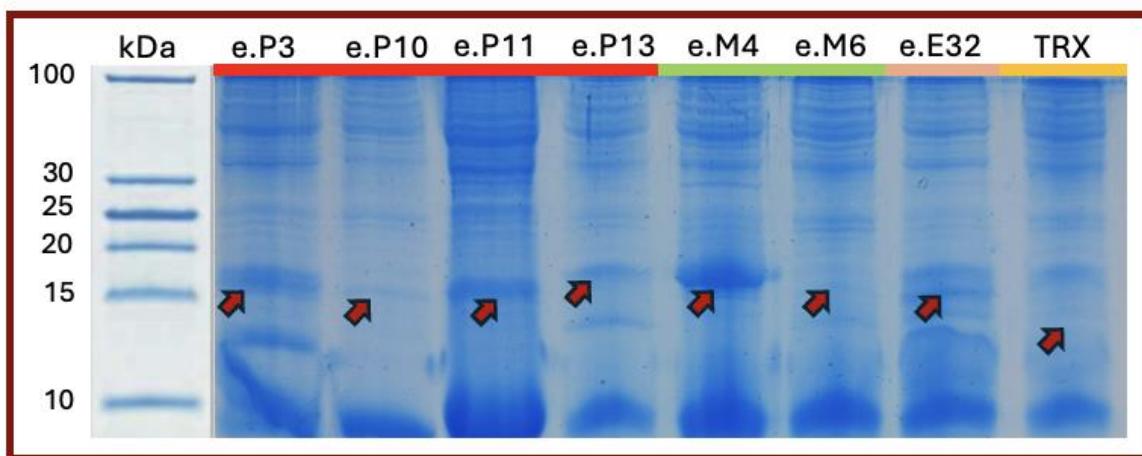


Figura 7: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % correspondiente a los extractos celulares, utilizada para el control de la producción de las defensinas P3, P10, P11, P13, M4, M6 y E32. TRX corresponde al control TRX. La letra e previo al nombre de la defensina hace referencia al extracto de dicha defensina. Las flechas rojas se encuentran señalando las bandas correspondientes a la proteína de fusión (defensina-tiorredoxina-histag).

La electroforesis SDS-PAGE desnaturizante en gel de poliacrilamida al 15 % (Figura 7) se muestran bandas correspondientes a la Defensina-tiorredoxina-Histag, con un peso molecular aproximado de 17–19 kDa, resultado de la suma de la defensina (5–7 kDa) y TRX-HisTag (12 kDa). Si bien se observa la presencia de las bandas esperadas, también

se evidencian diferencias en los niveles de expresión, ya que no todas presentan sobreexpresión, como es el caso de e.M4.

6.1.2 Screening de actividad antifúngica de los extractos

a partir de los extractos para cada una de las defensinas, se llevó a cabo un *screening* cualitativo para evaluar la actividad antifúngica de las defensinas. El crecimiento fúngico se monitoreo mediante mediciones de absorbancia a 600nm hasta el tercer día de incubación ya que a partir de ese momento la esporulación interfería con las lecturas. Paralelamente, se realizó observación directa de la esporulación hasta los 7 días, momento en el que el control sin defensina alcanzó la esporulación completa. Este enfoque permitió identificar de manera rápida y eficiente los extractos con efecto inhibitorio sobre el desarrollo fúngico, proporcionando información preliminar sobre el potencial antifúngico de cada defensina.

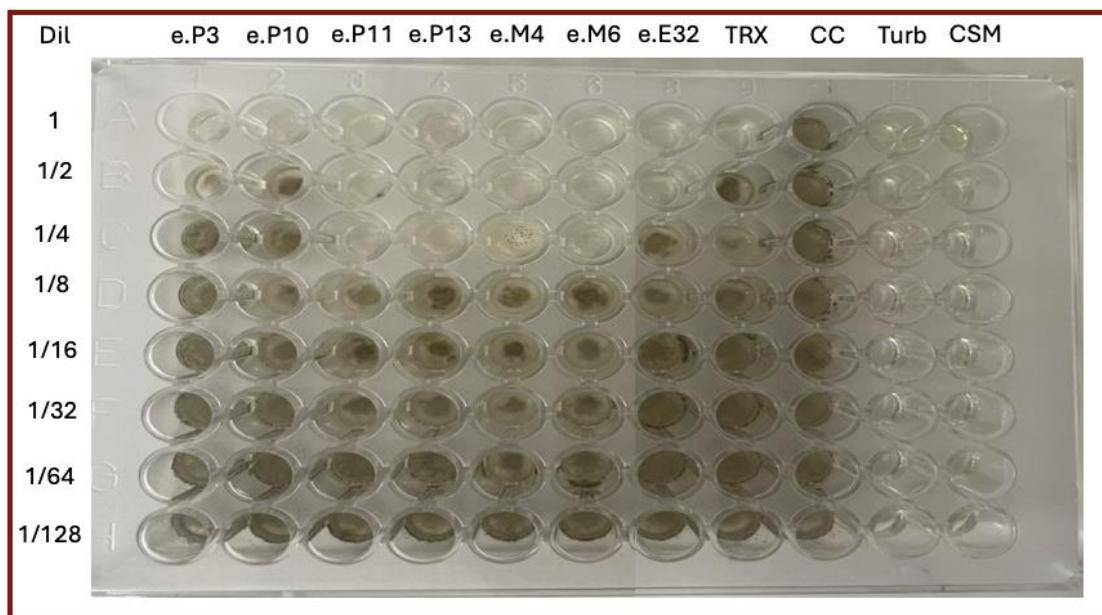


Figura 8: Actividad antifúngica de los extractos de defensinas contra *B. cinerea* tras 7 días de incubación a 28 °C. A la izquierda se muestran las diluciones seriadas de los extractos de cada defensinas (nombre de las defensinas). Se incluyen los controles de TRX, crecimiento (CC), turbidez (Turb) y sin microorganismo (CSM). Los resultados obtenidos en las replicas del screening (triplicado) fueron consistentes con lo mostrado.

Tablas en anexo 3

En la Figura 8 se observan los resultados con *B.cinerea*, de los cuatro controles realizados. En el CSM (control sin microorganismo) no se observó crecimiento o esporulación de los hongos, confirmando la ausencia de contaminación. El control de turbidez se empleó como blanco para las medidas de absorbancia, mientras que el control de crecimiento (CC) evidenció el desarrollo esperado de los hongos en el medio y definió la duración del experimento. El control TRX, correspondiente a la proteína recombinante sin defensina, presentó un nivel de esporulación menor que el observado el del CC. Por este motivo, el TRX se consideró el punto de referencia para evaluar la actividad de los extractos de las defensinas.

De este modo, en cada dilución analizada, los pocillos con un crecimiento fúngico superior al TRX se clasificaron como negativos (sin actividad), mientras que aquellos con un crecimiento igual o menor fueron considerados positivos (activos).

Adicionalmente a partir de los valores obtenidos de absorbancia se calcularon los porcentajes de inhibición para cada dilución y se compararon con los correspondientes al control TRX. Aquellas diluciones con valores de inhibición superiores a los del control TRX correspondiente se consideraron positivas (con actividad)

A partir de los resultados de la observación directa y porcentaje de inhibición (Anexo 3) se estableció el criterio de clasificación resumido en la tabla 2. Las defensinas se calificaron como activas (A) cuando la mayoría de los resultados obtenidos entre las réplicas fueron positivos; como inactivas (I) cuando predominaron los negativos y como no determinado (Nd) cuando los resultados fueron equivalentes.

Al integrar los resultados obtenidos por ambos métodos se generó un criterio global: si ambos eran activos se clasificó como A+, cuando ambos fueron inactivos como I-, en el caso de un activo y otro inactivo como Nd y en el caso en los que coexistió un resultado no determinado y un activo se los categorizó como A +/-.

Tabla .2 Resultados del screening de la actividad antifúngica de las defensinas. Las defensinas se clasificaron como activas (A+), inactivas (I+) o no determinadas (Nd). En los casos que se obtuvieron resultados diferentes entre los diferentes métodos se clasificó como A+/-

<i>P. expansum</i>				<i>B. cinerea</i>			
	Macro	Abs	Final		Macro	Abs	Final
e.P3	I	I	I ⁺	e.P3	I	I	I ⁺
e.P10	Nd	Nd	Nd	e.P10	I	I	I ⁺
e.P11	A	A	A ⁺	e.P11	A	A	A ⁺
e.P13	A	A	A ⁺	e.P13	A	A	A ⁺
e.M4	Nd	A	A ^{-/+}	e.M4	A	A	A ⁺
e.M6	A	Nd	A ^{-/+}	e.M6	I	A	Nd
e.E32	A	A	A ⁺	e.E32	I	A	Nd

Los extractos de defensinas mostraron distintos perfiles de actividad según el patógeno evaluado: P11, P13 y E32 fueron activas frente a *P. expansum*, mientras que P11, P13 y M4 lo fueron contra *B. cinerea*. Con base en estos resultados, se seleccionaron P11 y P13, por su acción frente a ambos patógenos, además de M4 (activa contra *B. cinerea*) y E32 (activa contra *P. expansum*). Frente a estos resultados, para este trabajo se decidió seguir solamente con las defensinas correspondientes a P11 y M4.

6.2 *Defensinas purificadas*

6.2.1 *Producción y purificación*

Con el objetivo de obtener las defensinas en su forma libre, se tomaron las muestras correspondientes al pico de elución (3 mL) obtenido en la primera cromatografía de afinidad para cada defensina. Las muestras, eluidas con buffer de elución contenido imidazol 50

μM , se sometieron a un proceso de diálisis y posterior digestión con la enzima AcTEV. Las muestras resultantes se volvieron a cargar en una columna de cromatografía de afinidad (IMAC), logrando separar con éxito las defensinas, que se recuperaron en la primera fracción de elución.

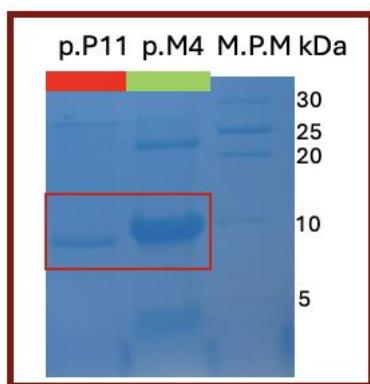


Figura 9: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% utilizada como control de la cromatografía de afinidad para la obtención de las defensinas recombinantes P11 y M4. Se incluye el marcador de peso molecular (M.P.M). La letra p previo al nombre de la defensina hace referencia a la defensina purificada. Las bandas correspondientes a las defensinas se señalan con un recuadro rojo.

La pureza y la eficiencia de la digestión se evaluaron mediante SDS-PAGE desnaturizante al 15 % (Figura 9). Se observaron bandas próximas a 10 kDa correspondientes a las defensinas purificadas. También aparecieron bandas adicionales: en P11 se detectó una señal por encima de los 25 kDa, pudiendo corresponder con alguna impureza, mientras que en M4 se detectó una señal que probablemente corresponda a dímeros de TRX-Histag (\approx 24 kDa). Estas señales sugieren que, aunque la mayoría de la purificación y la digestión fue eficiente, un pequeño porcentaje de proteína no se procesó completamente o formó agregados/multimeros durante el procedimiento.

A partir de los resultados de la electroforesis, se tomaron las muestras obtenidas de la fracción soluble de la segunda cromatografía IMAC y se les determinó la concentración proteica mediante la técnica de BCA; posteriormente, fueron liofilizadas y resuspendidas en un volumen adecuado para alcanzar una concentración de 40 μM .

6.2.2 Determinación de actividad antifúngica de las proteínas de fusión y defensinas purificadas

La actividad antifúngica de las defensinas purificadas (p.P11 y p.M4) frente a *B. cinerea* se evaluó mediante observación directa de la esporulación y mediciones de absorbancia, siguiendo tiempos de incubación que en el screening inicial (7 días y 3 días) (Figura 10). Se incluyeron como controles el CC (control de crecimiento), que permitió observar el desarrollo normal del hongo, el CSM (control sin microorganismo), que confirmó la ausencia de contaminación y el fungicida comercial propiconazol partiendo de una concentración de 130 μ M, demostró inhibición hasta una concentración de 4,06 μ M, validando la sensibilidad del patógeno. El ensayo se realizó por duplicado.

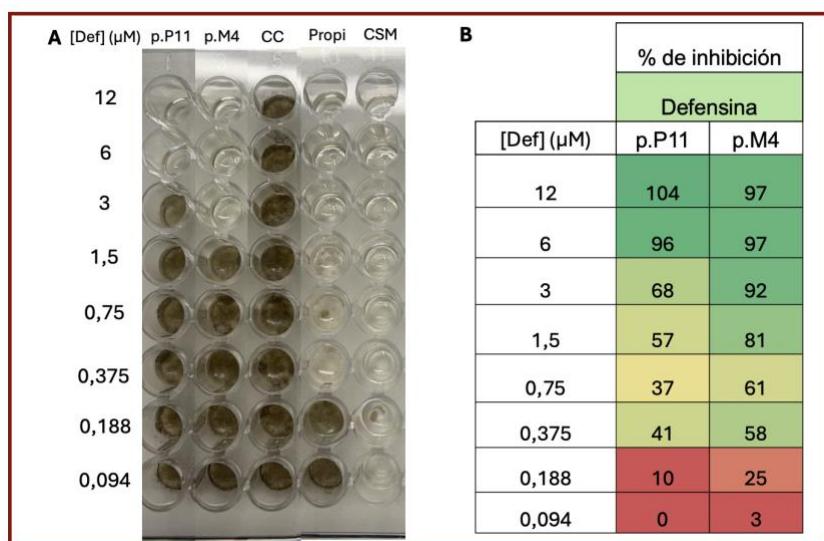


Figura 10: Resultados de CIM contra *B. cinerea*. (A) Resultados obtenidos a partir de observación directa a los 7 días de cultivo a 28°C obteniendo resultados similares en ambas replicas. (B) Resultados de los promedios de porcentaje de inhibición calculados a partir de datos obtenidos de medición de Abs a los 3 días a $\lambda=590$ nm. Tablas en anexo 3

En este ensayo se observó que contra *B. cinerea*, la defensina p.P11 alcanzó el 100 % de inhibición a 12 y 6 μ M. Mientras que la defensina p.M4 alcanzó valores de inhibición cercanos al 100% en las concentraciones 12, 6 y 3 μ M.

Por lo tanto, se determinó una CIM de 6 μ M para p.P11 y de 3 μ M para p.M4.

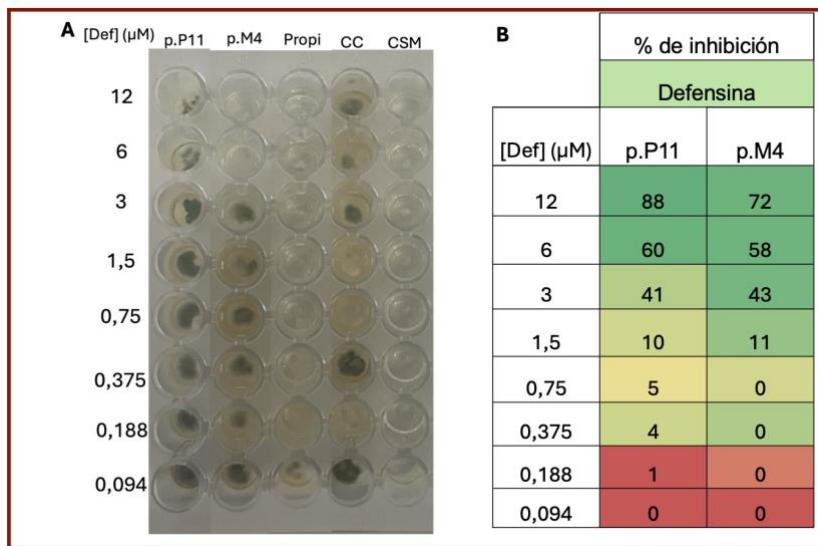


Figura 11: Resultados de CIM contra *P. expansum*. (A) resultados obtenidos a partir de observación directa a los 7 días de cultivo a 28°C. (B) resultados de % de inhibición calculados a partir de datos obtenidos de medición de Abs a los 3 días a $\lambda=590$ nm. Tablas en anexo 3.

En la Figura 11B se observa que, frente a *P. expansum*, se observa que el máximo porcentaje de inhibición obtenido fue de 88 % para p.P11 y 72 % para p.M4 a una concentración de 12 μ M. Por lo tanto no se logró determinar un valor de CIM de 100%. Para estimar el 100% de inhibición se calculó el coeficiente de inhibición (IC_{100}). Para esto se realizó una extrapolación de la gráfica de porcentaje de inhibición frente a la concentración de defensina (Figura 12). A partir de la ecuación de la recta obtenida, se estimó un IC_{100} de 13 μ M para p.P11 y de 16 μ M para p.M4.

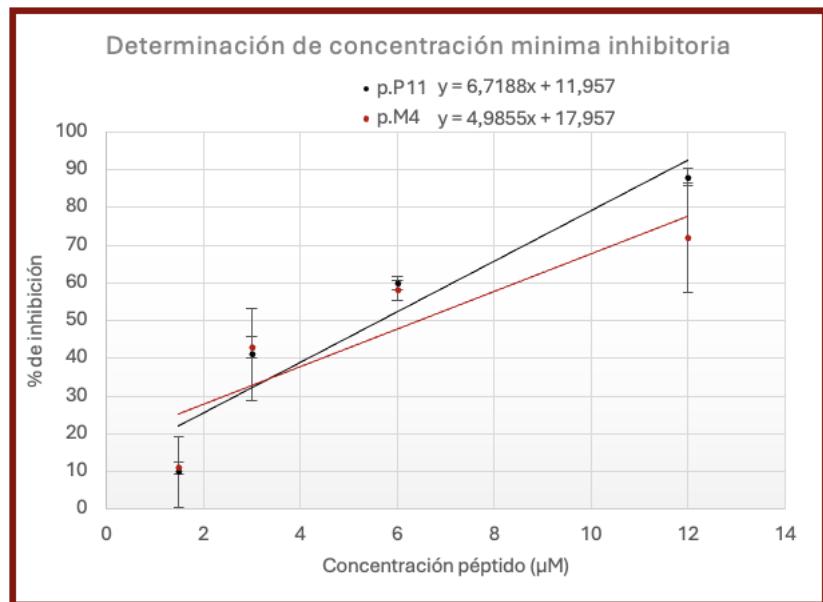


Figura 12: gráfico dé % de inhibición vs concentración de defensina

6.3 Ensayos en manzanas

6.3.1 Prueba de patogenicidad de las cepas de hongos utilizadas.

Previo a los ensayos con defensinas, se llevó a cabo una prueba de patogenicidad con el objetivo de confirmar la capacidad infectiva de las cepas de hongos empleadas. En este ensayo, la cepa de *Botrytis cinerea* provocó daño visible a los 7 días en los frutos tras la incubación (Figura 13B), mientras que una de las cepas de *Penicillium expansum* (CCMG 14g) no presentó signos de patogenicidad (Figura 13C). Por este motivo, se evaluó una segunda cepa de *P. expansum* (Pe2M) [39] que sí mostró patogenicidad, alcanzando una incidencia del 100% luego de 7 días de incubación a 28 °C (Figura 13D).

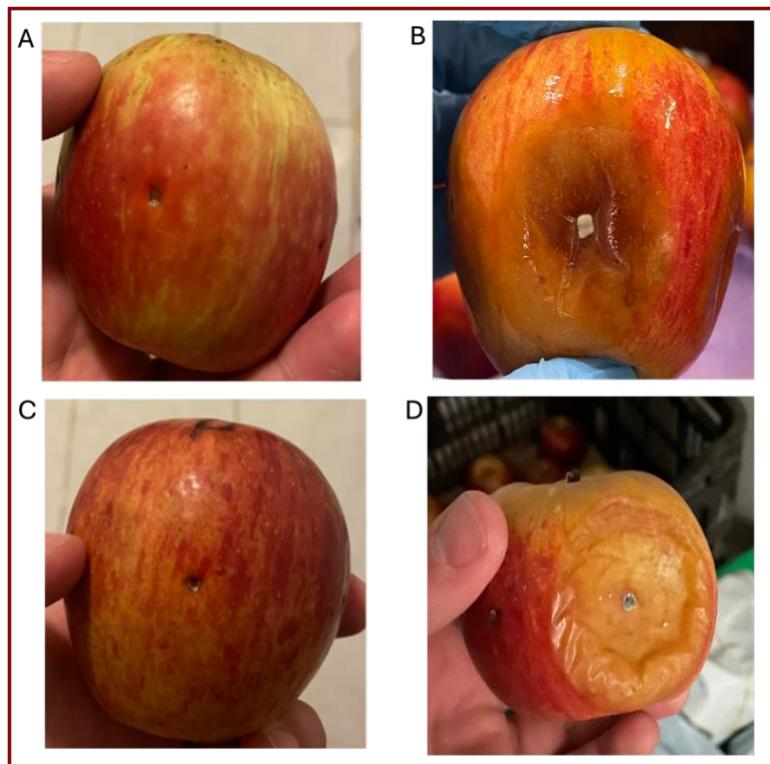


Figura 13 Ensayo de patogenicidad en manzanas, (A) corresponde al control sin inoculación (B) Inoculación con *B. cinerea* 7 días. (C) *P. expansum* (CCMG 14g). (D) Prueba con segunda cepa de *P. expansum* a los 7 días de cultivo.

6.3.2 *Evaluación de la capacidad inhibitoria de las defensinas frente a la acción de *B. cinerea* en manzanas*

Una vez determinados los valores de CIM para cada condición, se realizaron los ensayos en manzanas seleccionando tres concentraciones por defensina (Tabla 3), correspondientes a la CIM, su mitad (CIM1/2) y su doble (CIM×2). Como controles, se utilizaron manzanas inoculadas únicamente con las esporas del hongo, verificando el crecimiento esperado y determinando el día que se considera como el final del ensayo. Una vez que todas las heridas del control presentaron pudrición, se midieron los halos de pudrición, se determinó la incidencia de la enfermedad (% de heridas afectadas) y se calculó la severidad de la enfermedad.

Tabla 3. Concentraciones de defensinas utilizados en los ensayos contra *B. cinerea*, seleccionados a partir de los valores obtenidos en la determinación de CIM.

Abreviatura	Concentración para <i>B. cinerea</i> (μM)	
	p.P11	p.M4
CIM x 1/2	3	1,5
CIM x 1	6	3
CIM x 2	12	6

El primer ensayo presentó un inconveniente: la cámara de incubación no se mantuvo en el rango previsto de 0–1 °C, sino a 10 °C durante 7 días. A pesar de ello, los resultados fueron analizados e interpretados como una incubación acelerada (Figura 14), considerando que la mayor temperatura favoreció un proceso de pudrición más rápido.



Figura 14 Aspecto de manzanas luego de 7 días de cultivo a 10°C.

Al séptimo día de incubación se midieron los halos de pudrición en las heridas de las manzanas, se determinó la incidencia y se calculó la severidad (tablas en Anexo 2).

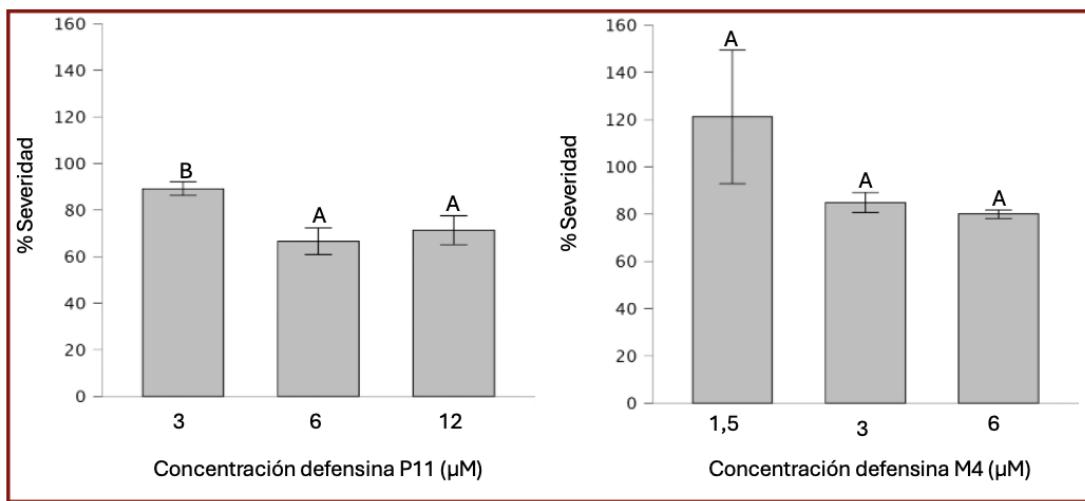


Figura 15 Severidad de la pudrición causada por *B. cinerea* en manzanas Red Delicious inoculadas con defensinas purificadas P11 y M4 en ensayo acelerado (7 días a 10 °C). Las concentraciones utilizadas se indican en la figura. Las barras representan el error estándar (n=30). Tratamiento con la misma letra indica que no hay diferencia significativa ($p>0,05$)

Los valores obtenidos se muestran en la Figura 15. En estas condiciones, ninguna de las defensinas evaluadas mostró efecto inhibitorio sobre la incidencia de la enfermedad, que se mantuvo en el 100 % en todos los tratamientos. Sin embargo sí se observó una reducción en la severidad de la enfermedad, lo que indica efecto inhibitorio de las defensinas en la progresión del daño. Para la defensina p.P11, la concentración de 3 μM redujo la severidad en un 11 % respecto al control, mientras que las concentraciones de 6 y 12 μM mostraron reducciones del 33 % y 29 %, respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas. En el caso de p.M4, la concentración de 1,5 μM no produjo cambios cuantificables respecto al control, mientras que las concentraciones de 3 y 6 μM redujeron la severidad en un 10 % y 20 %, respectivamente, aunque sin diferencias significativas entre tratamientos.

Dado que no se observaron diferencias relevantes entre CIM \times 1 y CIM \times 2 en p.M4, ni entre IC100 \times 1 e IC100 \times 2 en p.P11, y considerando además la disponibilidad limitada de las defensinas, se decidió no incluir las concentraciones más altas en el segundo ensayo.

El segundo ensayo se realizó durante 30 días a 0 a 1 °C, empleando las concentraciones de 3 y 6 μ M para p.P11 y 1,5 y 3 μ M para p.M4 (Figura 16, Las tablas de datos se pueden ver en Anexo 2).

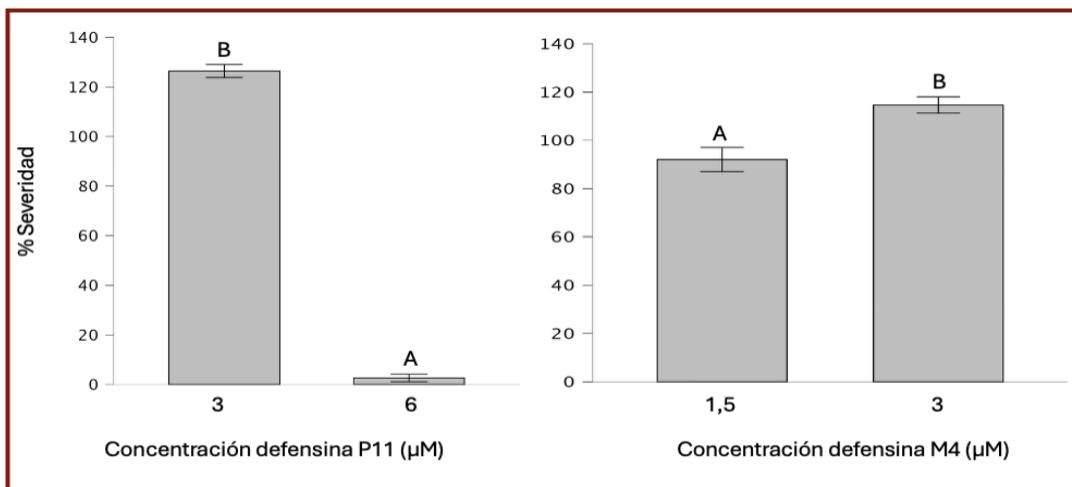


Figura 16 Severidad de la pudrición causadas por *B. cinerea* en manzanas Red Delicious inoculadas con defensinas purificadas P11 y M4 en ensayo (30 días a 0°C). Las concentraciones utilizadas se indican en la figura. Las barras representan el error estándar (n=30). Tratamiento con la misma letra indica que no hay diferencia significativa ($p>0,05$).

Se estudió la defensina pura. En estas condiciones, el tratamiento con p.P11 a 6 μ M mostró un marcado efecto inhibitorio, reduciendo la incidencia de la enfermedad al 14 % y la severidad al 3 % en comparación con el control. A la concentración de 3 μ M, p.P11 no presentó efecto sobre la enfermedad, con incidencia y severidad del 100 %. Por su parte, p.M4 no evidenció control de la enfermedad en ninguna de las concentraciones evaluadas, manteniéndose las incidencias y severidades cercanas al 100 %.

A continuación, se evaluó la efectividad de los extractos de defensinas para controlar *B. cinerea* en manzanas Red Delicious, con un enfoque orientado a la aplicación a la industria, utilizando directamente los productos de lisis celular. Como control adicional, se incluyeron el control TRX (extractos provenientes de la cepa que produce únicamente tiorredoxina-histag sin defensina), con el fin de distinguir los efectos atribuibles a la defensina de los posibles efectos de la defensina-tiorredoxina-histag y restos celulares.

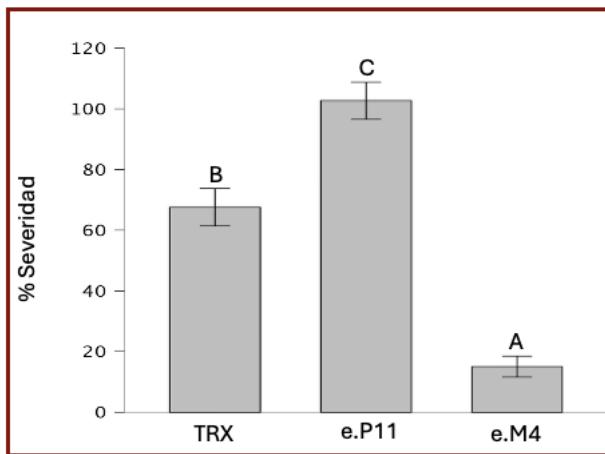


Figura 17 Severidad de la enfermedad causada por *B. cinerea* en manzanas Red Delicious inoculadas con extractos de las defensinas P11 (e.P11) y M4 (e.M4) en ensayo (30 días a 0 °C). Cómo control se utilizó TRX correspondiente al extracto de la proteína TRX-Histag sin defensina (incluye restos celulares) que permite diferencias la actividad específica de las defensinas. Las barras representan el error estándar (n=30). Tratamiento con la misma letra indica que no hay diferencia significativa ($p>0,05$)

El tratamiento con el extracto e.P11 no mostró actividad antifúngica, ya que tanto la incidencia como la severidad de la enfermedad se mantuvieron cercanas al 100 %. En contraste, el extracto e.M4 sí presentó efecto, con una incidencia reducida al 50 % y una severidad de la enfermedad del 15 %. (Figura 17). El extracto TRX no modificó la incidencia de la enfermedad, que se mantuvo en el 100 % de las heridas. Se observó una leve reducción en la severidad (68 % frente al control); aunque este efecto no puede considerarse actividad antifúngica relevante, permitió diferenciar claramente la actividad específica del extracto e.M4.

6.3.3 Evaluación de control de *P. expansum* en manzanas

Para evaluar la efectividad frente a *P. expansum*, se realizaron ensayos en manzanas utilizando tanto los extractos (e.P11 y e.M4) como las defensinas purificadas. Para los péptidos purificados, también se seleccionaron tres concentraciones por defensina, correspondientes a la CIM determinada, su mitad (CIM 1/2) y su doble (CIM×2), siguiendo el mismo criterio que se utilizó en los ensayos con *B. cinerea* (Tabla 4).

Tabla 4 Distintas concentraciones de defensinas que se utilizaron en los ensayos. estos valores obtuvieron a partir del grafico % de inhibición vs concentración de defensina .

Abreviatura	Concentración para <i>P. expansum</i> (μM)	
	p.P11	p.M4
IC100 x 1/2	7	8
IC100 x 1	13	16
IC100 x 2	26	32

Los resultados obtenidos con los extractos se muestran en la Figura 18 y los datos correspondientes a las tablas en el Anexo 2. En estas condiciones, ninguno de los extractos evaluados fue capaz de controlar el desarrollo del hongo, presentándose incidencias y severidades cercanas al 100 %. De manera similar, el extracto de control TRX no mostró efecto antifúngico frente a *P. expansum*.

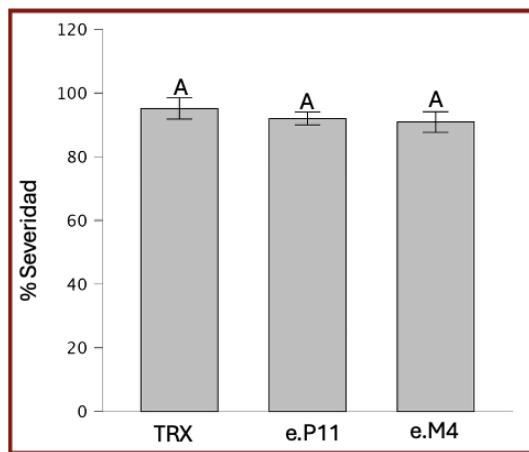


Figura 18 severidad de las enfermedades causadas por *P. expansum* en manzanas Red Delicious inoculadas con extractos P11 y M4. Las barras representan el error estándar (n=30). Tratamiento con la misma letra indica que no hay diferencia significativa ($p>0,05$)

Se realizó también un ensayo utilizando las defensinas purificadas en las concentraciones mencionadas (Tabla 4). Sin embargo, no fue posible obtener resultados válidos debido a un inconveniente con el control, que debía indicar el crecimiento esperado del hongo y permitir definir el punto de finalización del experimento. Algunas heridas no presentaron síntomas de pudrición, mientras que otras mostraron halos extensos y superpuestos. Por limitaciones de tiempo y disponibilidad de material, este ensayo no pudo repetirse.

7. Discusión

En este trabajo se evaluaron siete defensinas de origen vegetal: PdDf3, PdDf10, PdDf11 (P11) y PdDf13 (P13) de *Peltophorum dubium* (Ibirapita), MiDf4 (M4) y MiDf6 de *Maytenus ilicifolia* (Congorosa), y EcgDf1 (E32) de *Erythrina crista-galli* (Ceibo), cuya producción recombinante en *Escherichia coli* había sido previamente optimizada por el grupo de trabajo. A partir del screening inicial frente a los patógenos de interés, *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*, cuatro defensinas (P11, P13, M4 y E32) mostraron un efecto inhibitorio prometedor. Este trabajo se enfocó en P11 y M4 que fueron purificadas y para estudios detallados que incluyeron la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) y la evaluación de su capacidad para reducir el deterioro de manzanas Red Delicious durante la conservación poscosecha en cámara fría.

Para los ensayos *in vitro* realizados sobre el hongo *B. cinerea*, mostraron que tanto P11 como M4 podían inhibir significativamente el crecimiento del hongo (valores de CIM: 6 μ M para P11 y 3 μ M para M4). La evaluación del efecto inhibitorio sobre las manzanas, se observaron diferencias entre ambas defensinas. La defensina p.P11 mantuvo un alto nivel de eficacia en una concentración de 6 μ M, reduciendo la incidencia y la severidad de la enfermedad de manera significativa (incidencia: 14 %, severidad: 3 %), mientras que p.M4, a pesar de mostrar inhibición *in vitro*, no mostró efecto sobre la progresión del daño en el fruto. Estas diferencias podrían atribuirse a factores presentes en el entorno de la manzana, como la absorción del péptido, la interacción con componentes celulares del fruto, el pH y otras propiedades fisiológicas que pueden afectar la actividad antifúngica observada. Badosa y colaboradores (2009) [42] reportaron que la eficacia antifúngica de péptidos sintéticos frente a *P. expansum* disminuye notablemente al pasar de ensayos *in vitro*, donde se alcanzan inhibiciones superiores al 90 % mientras que en ensayo *in vivo* en frutos, la reducción de la enfermedad no supera el 50 – 60 %, reforzando la idea de que las

condiciones del tejido vegetal, su microambiente y la disponibilidad real del compuesto en el sitio de infección limitan la acción del péptido.

Al comparar la acción de las defencinas en el extractos con las defensinas purificadas, se observó que el extracto de M4 redujo la incidencia a la mitad y disminuyó la severidad al 15 %, mientras que la defensina purificada no mostró efecto en las concentraciones ensayadas (1.5, 3 y 6 μ M). En el caso de P11, la defensina purificada fue más efectiva que el extracto, ya que este último no produjo disminución de la incidencia ni de la severidad de la enfermedad.

Las diferencias de comportamiento observadas entre las defensinas purificadas y los extractos podrían explicarse por varios factores. Primero, en los extractos las defensinas están fusionadas a la proteína tiorredoxina, lo que podría enmascarar o alterar su actividad frente al hongo. Segundo, los extractos constituyen mezclas complejas que incluyen material celular residual y otras proteínas, lo que podría interferir con la acción de las defensinas. Por último, también es posible que las concentraciones efectivas de defensina difieran entre las preparaciones: en los péptidos purificados la concentración es conocida y controlada, mientras que para cuantificar la defensina en los extracto, requiere otro tipo de estrategias, equipos con los que se contaban. En el caso de M4, la alta producción de la proteína de fusión (Figura 7) sugiere que la proporción de defensina en el extracto podría ser superior a la utilizada en la preparación purificada. En contraste, en P11, la cantidad de defensina en el extracto podría ser menor que la utilizada en la preparación purificada, lo que concuerda con la observación de que solo la defensina purificada mostró actividad antifúngica significativa.

Los resultados obtenidos son consistentes con trabajos previos que han evaluado la aplicación de péptidos antimicrobianos en frutas, aunque la eficacia observada varía según el tipo de péptido y el fruto analizado. Por ejemplo, Li Fan y colaboradores (2023) [43] reportaron que el péptido marino Epinecidin-1 presentó una potente actividad antifúngica

contra *B.cinerea*, con una inhibición del 66% del crecimiento micelial *in vitro*. En duraznos inoculados, se redujo la incidencia de la enfermedad en un 36,7 % y 44,7% MIC respectivamente. En estudios sobre *P. expansum*, Huang y colaboradores (2021) [44] utilizaron péptidos purificados en peras y lograron reducciones del 42 % y del 29,2 % en la incidencia de la infección de las distintas cepas utilizadas. Badosa y colaboradores (2009) [42] emplearon péptidos híbridos de cecropina A y melitina en manzanas Golden, logrando disminuir la severidad un 56 %, comparable a la obtenida con el fungicida comercial Imazalil [41].

En este contexto, los resultados obtenidos en el presente trabajo con P11 purificado son particularmente relevantes: se logró una reducción de la incidencia y de la severidad de *B. cinerea* en manzanas Red Delicious del 86 % y 97 %, respectivamente, lo que indica un nivel de eficacia superior al reportado en estudios como los mencionados anteriormente y destaca el potencial de esta defensina como agente de biocontrol poscosecha.

Los resultados en este trabajo resalta la posibilidad de utilizar productos de lisis directamente como agentes de biocontrol, sin necesidad de purificación, lo que podría facilitar su aplicación práctica en poscosecha.

8. Conclusiones

En este trabajo se estudio la capacidad de las defensinas vegetales y el extractos (fraccion soluble de la producción recombinante) en controlar la infección por *B. cinerea* y *P. expansum* en manzanas Red Delicious durante la conservación poscosecha en cámara fría. Los estudios de *screening* evidenciaron actividad antifungicas en los extractos evaluados, e.P11, e.M4, e.P13 y e.E32 mostraron actividad antifúngica frente a ambos patógenos. La defensina purificada P11 a 6 μ M presentó una elevada eficacia frente a *B. cinerea*, reduciendo la incidencia y la severidad de la enfermedad en un 86 % y 97 % sobre

manzanas Red delicious, respectivamente, lo que evidencia su alto potencial como agente de biocontrol poscosecha. Por su parte, el extracto e.M4 mostró un efecto prometedor frente a *B. cinerea*, disminuyendo la incidencia al 50 % y la severidad al 15 %, aunque la M4 purificada no alcanzó el mismo nivel en ninguna de las concentraciones evaluadas. En conjunto, los hallazgos de este estudio destacan el valor de la defensina PdDf11 (P11), aislada del árbol nativo *Peltophorum dubium*, como una alternativa prometedora a los agentes fungicos químicos para el control de *B. cinerea* en manzanas, y subrayan el potencial de explorar distintas formas de producción de defensinas para optimizar su actividad antifúngica en condiciones poscosecha.

9. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo abren diversas posibilidades para continuar la investigación y explorar la aplicabilidad de las defensinas vegetales como agentes de biocontrol poscosecha. En términos experimentales, sería valioso ampliar los ensayos en manzanas con *P. expansum*, incluyendo la evaluación de las defensinas purificadas, cuyos estudios previos no pudieron completarse, así como repetir la determinación de la actividad inhibitoria con concentraciones más elevadas para intentar obtener un valor de CIM real. Por otro lado, con respecto a *B. cinerea*, repetir algunos ensayos permitiría profundizar la comparación entre defensinas purificadas y extractos. En el caso de la defensina M4, esto permitiría confirmar si los resultados favorables observados con el extracto se traducen en actividad de la proteína purificada cuando se ajusta la concentración. Para P11, y considerando la hipótesis de que la cantidad de defensina presente en el extracto fue inferior a la utilizada en la preparación purificada, una perspectiva inmediata sería evaluar un extracto más concentrado para explorar su potencial como agente de biocontrol sin necesidad de purificación. Desde un enfoque de aplicación práctica, este trabajo también abre la posibilidad de extender la estrategia a otras frutas y patógenos, evaluando la eficacia de estas defensinas en distintos escenarios de poscosecha y explorando su potencial como agentes de biocontrol sin necesidad de purificación, lo que facilitaría futuras implementaciones.

10. Bibliografía

1. Instituto Nacional de Estadística. (2024). *Anuario estadístico nacional 2024: Agropecuario*. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.
2. Ackermann, M. N. (2023) Frutales de hoja caduca: Situación y perspectivas.
3. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (2014). Guía de buenas prácticas agrícolas para la producción de frutas y hortalizas frescas en Uruguay.
4. Instituto Nacional de Alimentación. (2023). Manual de tipificación de calidad de frutas y verduras.
5. Producción Integrada Uruguay. (2020). Norma para la producción integrada de manzano.
6. Toivonen, P. (2007). Fruit maturation and ripening and their relationship to quality. *Stewart Postharvest Review*, 3, 1-5.
7. Giovannoni J. J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant cell*, 16 Suppl(Suppl), S170–S180. <https://doi.org/10.1105/tpc.019158>
8. Seymour, G. B., Østergaard, L., Chapman, N. H., Knapp, S., & Martin, C. (2013). Fruit development and ripening. *Annual review of plant biology*, 64, 219–241. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120057>
9. Leoni, C., & Mondino, P. (2003). Enfermedades poscosecha en frutas de hoja caduca, uva de mesa y cítricos.
10. Mondino, P., & Vero, S. (2006). Control biológico de patógenos de plantas.
11. Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & Blackwell, M. M. (1996). *Introductory mycology* (4th ed.). Wiley.
12. Nguyen, P. A., Strub, C., Fontana, A., & Schorr-Galindo, S. (2017). Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. *Biological Control*, 104, 10–27. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2016.10.004>
13. Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
14. Jabłońska-Trypuć, A., et al. (2023). Selected fungicides as potential estrogenic micropollutants in the environment. *Molecules*, 28(21). <https://doi.org/10.3390/molecules28217437>
15. Dotson, D. A. (2018). *Imazalil: Risk Assessment*. U.S. EPA Office of Chemical Safety.
16. Steeger, T. (2007). Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances Report. U.S. EPA.
17. Temkin, A., & Galligan, T. (s.f.). Fungicides commonly found on citrus linked to breast cancer risk. *Environmental Working Group*.
18. Jin, C., Luo, T., Fu, Z., & Jin, Y. (2018). Chronic exposure of mice to low doses of imazalil induces hepatotoxicity. *Environmental Toxicology*, 33(6), 650–658. <https://doi.org/10.1002/tox.22550>

19. Office of Environmental Health Hazard Assessment. (2025). *Imazalil*. California OEHHA.
20. New Jersey Department of Health. (2008). Right to Know Hazardous Substance Fact Sheet.
21. Arrarte, I. A. E. (2019). Estrategias para mantener la calidad de frutas durante el almacenamiento poscosecha en frío (Tesis doctoral).
22. María, B., Díaz, V., & Garmendia, D. (2015). Control biológico en postcosecha de manzanas "Red Delicious". *[Indetaxa]*.
23. Bairdara, P., & Mandal, S. (2022). Plant-derived antimicrobial peptides: Novel preservatives for the food industry. *Foods*, 11(16). <https://doi.org/10.3390/foods11162415>
24. Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C., & Yang, X. (2021). Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. *Botanical studies*, 62(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00312-x>
25. Kulaeva, O., Kliukova, M., Afonin, A., Sulima, A., Zhukov, V., & Tikhonovich, I. (2020). The role of plant antimicrobial peptides (AMPs) in response to biotic and abiotic environmental factors. *Biological Communications*, 65.
26. Huang, Y., Gao, L., Lin, M., & Yu, T. (2021). Recombinant expression of antimicrobial peptides in *Pichia pastoris*: A strategy to inhibit *Penicillium expansum* in pears. *Postharvest Biology and Technology*, 171, 111298.
27. Vriens, K., Cammue, B. P., & Thevissen, K. (2014). Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(8), 12280–12303. <https://doi.org/10.3390/molecules190812280>.
28. Montesinos E. (2023). Functional Peptides for Plant Disease Control. *Annual review of phytopathology*, 61, 301–324. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-021722-034312>
29. Tetorya, M., et al. (2023). Plant defensin MtDef4-derived antifungal peptide with multiple modes of action. *Molecular Plant Pathology*, 24(8), 896–913.
30. Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual review of phytopathology*, 42, 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
31. Rodríguez, S. D. (2018). Prospección de defensinas y enaquininas de plantas nativas para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.
32. Rodríguez, S., et al. (2019). Antimicrobial peptides in the seedling transcriptome of *Peltophorum dubium*. *[Indetaxa]*.
33. Erdem Büyükkiraz, M., & Kesmen, Z. (2022). Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *Journal of applied microbiology*, 132(3), 1573–1596. <https://doi.org/10.1111/jam.15314>
34. Shafee, T. M., Lay, F. T., Phan, T. K., Anderson, M. A., & Hulett, M. D. (2017). Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 74(4), 663–682. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2344-5>.
35. Kovaleva, V., Bukhteeva, I., Kit, O. Y., & Nesmelova, I. V. (2020). Plant Defensins from a Structural Perspective. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5307. <https://doi.org/10.3390/ijms21155307>
36. Castro, R., et al. (2020). Método rápido de análisis funcional de péptidos antimicrobianos recombinantes. *XV Congreso Nacional de Biotecnología*.

37. Castro, R., et al. (2020). Explorando el poder antimicrobiano de defensinas recombinantes. *XV Congreso Nacional de Biotecnología*.
38. Pianzzola, M. J., Moscatelli, M., & Vero, S. (2004). Characterization of *Penicillium* Isolates Associated with Blue Mold on Apple in Uruguay. *Plant disease*, 88(1), 23–28. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.1.23>
39. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed., Vol. 2). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
40. Madden, L. V., Hughes, G., & Van den Bosch, F. (2007). *The study of plant disease epidemics*. APS Press. <https://repository.rothamsted.ac.uk/item/98qq6/the-study-of-plant-disease-epidemics>
41. Badosa, E., et al. (2009). Sporicidal activity of synthetic antifungal undecapeptides and control of *Penicillium* rot of apples. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5563–5569. <https://doi.org/10.1128/AEM.00711-09>
42. Fan, L., Wei, Y., Chen, Y., Jiang, S., Xu, F., Zhang, C., Wang, H., & Shao, X. (2023). Epinecidin-1, a marine antifungal peptide, inhibits *Botrytis cinerea* and delays gray mold in postharvest peaches. *Food chemistry*, 403, 134419. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134419>
43. JASP Team. (s. f.). *JASP (versión X)* [Software]. <https://jasp-stats.org>

11. Anexo 1

11.1 Medios y reactivos

11.1.1 Medios

- ❖ Luria-Bertani Broth (LB)

Se prepara empleando 10g de triptona, 5g de extracto de levadura y 10g de NaCl en 1 L de agua destilada. Se esteriliza mediante vapor a 121°C 1 atm 15 min

- ❖ Malt Extract Broth (MEB)

Se prepara empleando 30 g de MEB en 1L de agua destilada. Se esteriliza mediante vapor a 121°C 1 atm 15 min

- ❖ Potatoe Dextrose Agar (PDA)

Se prepara empleando 39g de PDA en 1 L de agua destilada. Se esteriliza mediante vapor a 121°C 1 atm 15 min

11.1.2 Soluciones Stocks

- ❖ Buffer Tris-HCl pH7,5 – 8,1

- ❖ Buffer de lisis

- Buffer tris-HCl pH 7,5-8 20mM
- NaCl 500 mM
- Glicerol 10 %
- Imidazol 10 mM (Sigma)

- ♦ Buffer de elución

- Buffer tris-HCl pH 7,5-8 20mM
- NaCl 500 mM
- Glicerol 10 %
- Imidazol 20 mM , 50 mM y 500 mM

- ♦ Buffer electroforesis

- Buffer tris-HCl 3M pH8,8 +0,3 %SDS (Vf=150mL)
 - Tris Base 54,5g
 - 12 mL HCl cc
 - 2,25 mL SDS 20%
- Buffer tris-HCl 3M pH6,8 +0,3 %SDS
 - Tris Base 54,5g
 - 12 mL HCl cc
 - 2,25 mL SDS 20%
- Buffer de carga (Thermofisher))
- Buffer de corrida
 - 12,08g Tris Base (0,1M)
 - 17,92g Tricina
 - 5 mL SDS 20%
- Se lleva al litro con agua destilada

- ❖ Gel de poliacrilamida

- gel de resolución (15 %)
 - 3,3 mL Buffer Tris-HCL 3M pH 8,8 + 0,3 % SDS
 - 3,8 mL 40% acrilamida (29:1)
 - 4 µLTEMED
 - 100 µLPersulfato de amonio
 - 2,8 mL H₂O
- gel de apilamiento (5 %)
 - 1,25 mL Buffer Tris-HCL 3M pH6,8 + 0,3 % SDS
 - 0,62 mL 40% acrilamida (29:1)
 - 5 µLTEMED
 - 50µLPersulfato de amonio
 - 3,05 mL H₂O

- ❖ Solución de coomassie

- 1g Azul de Coomassie R250 (Sigma Aldrich , #B0149)
- 50 mL Ácido Acético glacial
- 250 mL EtOH 96%
- 200 mL H₂O

- ❖ Solución de destañido

- 50 mL Ácido Acético glacial

- 250 mL EtOH 96%
 - 200 mL H₂O
-
- ❖ Buffer Digestión
 - Buffer Tris-HCl 1M pH 8 + EDTA 10 mM
 - ❖ Ampicilina 50mg/mL
 - ❖ Tween 80%
 - ❖ Lizosima 1mg/mL (New England Biolabs)

12. Anexo 2

En este apartado se presentan las tablas de datos correspondientes a las mediciones de los halos de las manzanas y su posterior cálculo de % de severidad (% severidad = (Prom_{halodefensina} / Prom_{control}) x 100) y de Incidencia (%incidencia = (herida c/halo / total de heridas) x 100).

Las medidas de los halos se tomaron con un calibre, donde se tomó una medida horizontal y una vertical. Todas las medidas de los halos fueron corregidas por el tamaño correspondiente a la herida ocasionada (0,3 cm).

12.1 Primer ensayo (a 10 °C)

Las condiciones de este ensayo fueron 7 días a 10 °C.

Control: Manzanas inoculado con 10 μ L de suspensión de esporas *Botrytis cinerea* concentración 1×10^4 espora/mL. En cada condición se le agrego 10 μ L de las defensinas en las concentraciones CIMx $\frac{1}{2}$, CIMx1 y CIMx2 (Tabla 3) y luego 10 μ L de suspensión de esporas *Botrytis cinerea* concentración 1×10^4 espora/mL.

12.1.1 P11

Nº de herida	Control			C.I.M x $\frac{1}{2}$ (3 μ M)			
	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	% severidad
1	2,70	3,20	2,65	2,20	2,50	2,05	63,80
2	3,30	3,60	3,15	2,70	3,30	2,70	84,02
3	3,00	3,30	2,85	2,70	2,70	2,40	74,69
4	3,00	3,00	2,70	2,30	2,30	2,00	62,24
5	3,50	4,00	3,45	2,00	2,20	1,80	56,02
6	3,20	4,50	3,55	3,10	4,10	3,30	102,70
7	3,50	4,20	3,55	3,00	3,30	2,85	88,69
8	3,00	3,60	3,00	2,80	3,00	2,60	80,91
9	3,20	2,80	2,70	3,50	3,90	3,40	105,81

10	3,00	4,30	3,35	3,40	3,80	3,30	102,70
11	3,40	4,00	3,40	2,80	3,50	2,85	88,69
12	4,40	2,90	3,35	1,70	2,30	1,70	52,90
13	3,20	2,70	2,65	2,80	3,10	2,65	82,47
14	3,50	4,30	3,60	3,20	3,70	3,15	98,03
15	2,50	3,50	2,70	2,80	3,00	2,60	80,91
16	2,70	3,00	2,55	3,50	4,00	3,45	107,37
17	3,00	4,40	3,40	3,10	3,90	3,20	99,59
18	3,70	4,40	3,75	3,20	3,50	3,05	94,92
19	3,60	4,30	3,65	2,90	3,30	2,80	87,14
20	3,00	2,60	2,50	2,40	2,80	2,30	71,58
21	3,00	3,70	3,05	3,20	4,10	3,35	104,25
22	3,20	4,00	3,30	3,80	4,40	3,80	118,26
23	3,50	3,80	3,35	3,20	4,00	3,30	102,70
24	3,50	3,70	3,30	2,60	3,20	2,60	80,91
25	3,40	4,00	3,40	3,20	3,50	3,05	94,92
26	3,10	4,10	3,30	3,00	3,50	2,95	91,80
27	3,60	4,20	3,60	3,30	3,90	3,30	102,70
28	3,40	4,20	3,50	3,10	3,70	3,10	96,47
29	3,30	4,20	3,45	3,20	3,60	3,10	96,47
30	3,40	4,50	3,65	3,40	3,70	3,25	101,14
	Promedio de promedios		3,21				

Nº de herida	Control			C.I.M x 1 (6 µM)			
	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	% severidad
1	2,70	3,20	2,65	1,40	1,60	1,20	37,34
2	3,30	3,60	3,15	3,00	3,20	2,80	87,14
3	3,00	3,30	2,85	2,60	3,10	2,55	79,36
4	3,00	3,00	2,70	3,00	3,30	2,85	88,69
5	3,50	4,00	3,45	2,70	3,00	2,55	79,36
6	3,20	4,50	3,55	0,40	0,60	0,20	6,22
7	3,50	4,20	3,55	2,30	2,50	2,10	65,35
8	3,00	3,60	3,00	0,30	0,30	0,00	0,00
9	3,20	2,80	2,70	0,60	0,70	0,35	10,89
10	3,00	4,30	3,35	2,90	3,30	2,80	87,14
11	3,40	4,00	3,40	0,30	0,30	0,00	0,00
12	4,40	2,90	3,35	2,40	2,70	2,25	70,02
13	3,20	2,70	2,65	3,60	3,60	3,30	102,70
14	3,50	4,30	3,60	2,90	3,20	2,75	85,58
15	2,50	3,50	2,70	2,50	3,00	2,45	76,24

16	2,70	3,00	2,55	2,60	3,00	2,50	77,80
17	3,00	4,40	3,40	2,40	2,80	2,30	71,58
18	3,70	4,40	3,75	3,00	3,50	2,95	91,80
19	3,60	4,30	3,65	3,30	3,80	3,25	101,14
20	3,00	2,60	2,50	0,50	0,40	0,15	4,67
21	3,00	3,70	3,05	2,20	2,50	2,05	63,80
22	3,20	4,00	3,30	3,20	3,20	2,90	90,25
23	3,50	3,80	3,35	2,00	2,40	1,90	59,13
24	3,50	3,70	3,30	2,30	2,50	2,10	65,35
25	3,40	4,00	3,40	2,70	3,10	2,60	80,91
26	3,10	4,10	3,30	2,80	3,30	2,75	85,58
27	3,60	4,20	3,60	3,40	3,60	3,20	99,59
28	3,40	4,20	3,50	3,00	3,70	3,05	94,92
29	3,30	4,20	3,45	2,20	3,00	2,30	71,58
30	3,40	4,50	3,65	2,40	2,50	2,15	66,91
	Promedio de promedios		3,21				

Nº de herida	Control			C.I.M x 2 (12 µM)			
	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	% severidad
1	2,70	3,20	2,65	3,00	3,70	3,05	94,92
2	3,30	3,60	3,15	2,30	2,50	2,10	65,35
3	3,00	3,30	2,85	3,50	4,00	3,45	107,37
4	3,00	3,00	2,70	3,10	3,90	3,20	99,59
5	3,50	4,00	3,45	3,10	4,10	3,30	102,70
6	3,20	4,50	3,55	1,70	2,40	1,75	54,46
7	3,50	4,20	3,55	2,10	2,90	2,20	68,46
8	3,00	3,60	3,00	2,70	2,90	2,50	77,80
9	3,20	2,80	2,70	2,70	3,20	2,65	82,47
10	3,00	4,30	3,35	2,60	3,40	2,70	84,02
11	3,40	4,00	3,40	3,40	3,80	3,30	102,70
12	4,40	2,90	3,35	2,90	3,50	2,90	90,25
13	3,20	2,70	2,65	2,60	3,00	2,50	77,80
14	3,50	4,30	3,60	3,50	3,30	3,10	96,47
15	2,50	3,50	2,70	3,10	3,10	2,80	87,14
16	2,70	3,00	2,55	4,30	4,00	3,85	119,81
17	3,00	4,40	3,40	0,30	0,30	0,00	0,00
18	3,70	4,40	3,75	0,30	0,30	0,00	0,00
19	3,60	4,30	3,65	2,40	2,90	2,35	73,13
20	3,00	2,60	2,50	2,30	2,90	2,30	71,58
21	3,00	3,70	3,05	0,30	0,30	0,00	0,00

22	3,20	4,00	3,30	3,50	4,20	3,55	110,48
23	3,50	3,80	3,35	0,30	0,30	0,00	0,00
24	3,50	3,70	3,30	1,10	1,20	0,85	26,45
25	3,40	4,00	3,40	2,40	2,50	2,15	66,91
26	3,10	4,10	3,30	2,10	2,30	1,90	59,13
27	3,60	4,20	3,60	2,50	2,90	2,40	74,69
28	3,40	4,20	3,50	2,90	3,00	2,65	82,47
29	3,30	4,20	3,45	2,70	3,30	2,70	84,02
30	3,40	4,50	3,65	2,70	3,20	2,65	82,47
Promedio de promedios		3,21					

12.1.2 M4

Nº de herida	Control			C.I.M x 1/2 (1,5 µM)			
	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	% severidad
1	2,70	3,20	2,65	3,00	3,60	3,00	93,36
2	3,30	3,60	3,15	4,00	4,10	3,75	116,70
3	3,00	3,30	2,85	2,30	2,50	2,10	65,35
4	3,00	3,00	2,70	3,30	3,40	3,05	94,92
5	3,50	4,00	3,45	3,20	3,40	3,00	93,36
6	3,20	4,50	3,55	1,30	1,50	3,10	93,67
7	3,50	4,20	3,55	3,10	3,90	3,20	99,59
8	3,00	3,60	3,00	2,80	4,00	3,10	96,47
9	3,20	2,80	2,70	2,90	3,40	2,85	88,69
10	3,00	4,30	3,35	2,50	2,90	2,40	74,69
11	3,40	4,00	3,40	2,10	2,10	1,80	56,02
12	4,40	2,90	3,35	2,30	2,40	2,05	63,80
13	3,20	2,70	2,65	3,10	3,80	3,15	98,03
14	3,50	4,30	3,60	3,00	3,90	3,15	98,03
15	2,50	3,50	2,70	2,70	3,50	2,80	87,14
16	2,70	3,00	2,55	2,30	2,70	2,20	68,46
17	3,00	4,40	3,40	4,00	4,30	3,85	119,81
18	3,70	4,40	3,75	3,40	3,60	3,20	99,59
19	3,60	4,30	3,65	3,30	4,30	3,50	108,92
20	3,00	2,60	2,50	3,40	4,30	3,55	110,48
21	3,00	3,70	3,05	3,60	2,70	2,85	88,69
22	3,20	4,00	3,30	2,80	3,40	2,80	87,14
23	3,50	3,80	3,35	2,80	3,00	2,60	80,91
24	3,50	3,70	3,30	2,90	3,40	2,85	88,69
25	3,40	4,00	3,40	3,00	4,10	3,25	101,14

26	3,10	4,10	3,30	3,60	3,60	3,30	102,70
27	3,60	4,20	3,60	3,80	4,20	3,70	115,15
28	3,40	4,20	3,50	3,50	3,90	3,40	105,81
29	3,30	4,20	3,45	3,30	3,80	3,25	101,14
30	3,40	4,50	3,65	3,00	3,60	3,00	93,36
Promedio de promedios		3,21					

Nº de herida	Control			C.I.M x 1 (3 µM)			
	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	% severidad
1	2,70	3,20	2,65	3,70	3,30	3,20	99,59
2	3,30	3,60	3,15	2,90	3,00	2,65	82,47
3	3,00	3,30	2,85	3,20	3,90	3,25	101,14
4	3,00	3,00	2,70	2,50	3,00	2,45	76,24
5	3,50	4,00	3,45	2,70	3,20	2,65	82,47
6	3,20	4,50	3,55	3,30	4,10	3,40	105,81
7	3,50	4,20	3,55	3,20	3,80	3,20	99,59
8	3,00	3,60	3,00	3,50	2,80	2,85	88,69
9	3,20	2,80	2,70	3,30	3,90	3,30	102,70
10	3,00	4,30	3,35	3,00	3,10	2,75	85,58
11	3,40	4,00	3,40	2,30	2,70	2,20	68,46
12	4,40	2,90	3,35	3,10	3,70	3,10	96,47
13	3,20	2,70	2,65	2,10	2,70	2,10	65,35
14	3,50	4,30	3,60	3,10	3,70	3,10	96,47
15	2,50	3,50	2,70	2,20	2,80	2,20	68,46
16	2,70	3,00	2,55	2,90	3,60	2,95	91,81
17	3,00	4,40	3,40	3,80	4,30	3,75	116,70
18	3,70	4,40	3,75	3,40	4,10	3,45	107,37
19	3,60	4,30	3,65	3,70	4,00	3,55	110,48
20	3,00	2,60	2,50	3,00	3,70	3,05	94,92
21	3,00	3,70	3,05	2,50	3,20	2,55	79,36
22	3,20	4,00	3,30	2,60	3,90	2,95	91,81
23	3,50	3,80	3,35	2,70	3,80	2,95	91,81
24	3,50	3,70	3,30	2,80	3,50	2,85	88,69
25	3,40	4,00	3,40	3,30	4,20	3,45	107,37
26	3,10	4,10	3,30	0,30	0,30	0,00	0,00
27	3,60	4,20	3,60	1,50	2,00	1,45	45,12
28	3,40	4,20	3,50	2,60	2,80	2,40	74,69
29	3,30	4,20	3,45	2,50	3,00	2,45	76,24
30	3,40	4,50	3,65	1,90	2,10	1,70	52,90

Promedio de promedios

3,21

Nº de herida	Control			C.I.M x 2 (6 µM)			
	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	% severidad
1	2,70	3,20	2,65	2,00	1,80	1,60	49,79
2	3,30	3,60	3,15	2,70	3,20	2,65	82,47
3	3,00	3,30	2,85	2,30	2,30	2,00	62,24
4	3,00	3,00	2,70	3,00	3,20	2,80	87,14
5	3,50	4,00	3,45	2,50	2,50	2,20	68,46
6	3,20	4,50	3,55	2,80	2,80	2,50	77,80
7	3,50	4,20	3,55	2,50	3,10	2,50	77,80
8	3,00	3,60	3,00	3,20	3,70	3,15	98,03
9	3,20	2,80	2,70	3,00	3,00	2,70	84,02
10	3,00	4,30	3,35	2,70	2,70	2,40	74,69
11	3,40	4,00	3,40	2,60	2,60	2,30	71,58
12	4,40	2,90	3,35	3,10	3,60	3,05	94,92
13	3,20	2,70	2,65	2,70	3,70	2,90	90,25
14	3,50	4,30	3,60	3,10	3,50	3,00	93,36
15	2,50	3,50	2,70	3,00	3,00	2,70	84,02
16	2,70	3,00	2,55	2,30	2,50	2,10	65,35
17	3,00	4,40	3,40	2,80	3,00	2,60	80,91
18	3,70	4,40	3,75	2,80	3,00	2,60	80,91
19	3,60	4,30	3,65	3,10	3,00	2,75	85,58
20	3,00	2,60	2,50	2,30	2,80	2,25	70,02
21	3,00	3,70	3,05	2,90	3,00	2,65	82,47
22	3,20	4,00	3,30	2,70	3,30	2,70	84,02
23	3,50	3,80	3,35	2,90	3,00	2,65	82,47
24	3,50	3,70	3,30	2,60	3,40	2,70	84,02
25	3,40	4,00	3,40	2,50	3,00	2,45	76,24
26	3,10	4,10	3,30	2,50	3,30	2,60	80,91
27	3,60	4,20	3,60	2,80	3,00	2,60	80,91
28	3,40	4,20	3,50	2,70	3,00	2,55	79,36
29	3,30	4,20	3,45	2,90	3,10	2,70	84,02
30	3,40	4,50	3,65	2,80	3,40	2,80	87,14
Promedio de promedios		3,21					

12.2 Ensayo en manzanas

12.2.1 *Botrytis cinerea*

Defensinas

Las condiciones de este ensayo fueron 30 días a 0-1 °C.

Control: Manzanas inoculado con 10 µL de suspensión de esporas *Botrytis cinerea* concentración 1×10^4 espora/mL. En cada condición se le agrego 10 µL de defensina en las concentraciones CIMx½, CIMx1 (Tabla 3) y luego 10 µL de suspensión de esporas *Botrytis cinerea* concentración 1×10^4 espora/mL.

○ **P11**

Nº de herida	Control			C.I.M x 1/2 (3 µM)			
	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	% severidad
1	1,90	1,80	1,55	3,90	3,40	3,35	1,59
2	1,90	2,00	1,65	2,50	2,70	2,30	109,26
3	2,50	2,30	2,10	2,70	3,30	2,70	128,27
4	2,80	2,60	2,40	2,50	3,30	2,60	123,52
5	2,00	2,10	1,75	2,60	3,50	2,75	130,64
6	2,60	2,30	2,15	2,70	2,50	2,30	109,26
7	2,30	2,70	2,20	2,90	3,40	2,85	135,39
8	2,30	2,40	2,05	2,80	3,00	2,60	123,52
9	2,80	2,40	2,30	2,80	3,60	2,90	137,77
10	2,40	2,40	2,10	2,70	2,80	2,45	116,39
11	3,00	3,00	2,70	2,50	2,50	2,20	104,51
12	2,80	2,70	2,45	2,40	2,80	2,30	109,26
13	2,10	2,30	1,90	2,80	2,90	2,55	121,14
14	1,90	1,80	1,55	2,70	3,10	2,60	123,52
15	2,90	2,70	2,50	2,80	2,60	2,40	114,01
16	2,00	2,10	1,75	2,80	3,00	2,60	123,52
17	2,30	1,90	1,80	2,70	3,00	2,55	121,14
18	2,30	2,50	2,10	2,30	2,80	2,25	106,89
19	1,90	2,00	1,65	2,30	2,50	2,10	99,76

20	2,10	1,80	1,65	2,60	2,80	2,40	114,01
21	2,50	2,50	2,20	2,90	3,80	3,05	144,89
22	1,20	1,50	1,05	3,20	3,10	2,85	135,39
23	2,60	2,90	2,45	2,90	3,40	2,85	135,39
24	2,80	3,00	2,60	3,20	3,60	3,10	147,27
25	2,80	3,20	2,70	2,60	3,50	2,75	130,64
26	2,90	2,70	2,50	3,50	3,10	3,00	142,52
27	2,80	2,70	2,45	2,50	3,70	2,80	133,02
28	2,60	2,80	2,40	2,60	3,40	2,70	128,27
29	2,50	2,50	2,20	3,20	3,40	3,00	142,52
30	2,60	2,60	2,30	3,40	3,10	2,95	140,14
Promedio de promedios		2,11					

Nº de herida	Control			C.I.M x 1 (6 µM)			
	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	% severidad
1	1,90	1,80	1,55	0,30	0,30	0,00	0,00
2	1,90	2,00	1,65	0,30	0,30	0,00	0,00
3	2,50	2,30	2,10	0,30	0,30	0,00	0,00
4	2,80	2,60	2,40	0,30	0,30	0,00	0,00
5	2,00	2,10	1,75	0,30	0,30	0,00	0,00
6	2,60	2,30	2,15	1,00	0,90	0,65	30,88
7	2,30	2,70	2,20	0,30	0,30	0,00	0,00
8	2,30	2,40	2,05	0,30	0,30	0,00	0,00
9	2,80	2,40	2,30	0,30	0,30	0,00	0,00
10	2,40	2,40	2,10	0,30	0,30	0,00	0,00
11	3,00	3,00	2,70	0,60	0,30	0,15	7,13
12	2,80	2,70	2,45	0,30	0,30	0,00	0,00
13	2,10	2,30	1,90	0,50	0,40	0,15	7,13
14	1,90	1,80	1,55	0,30	0,30	0,00	0,00
15	2,90	2,70	2,50	0,30	0,30	0,00	0,00
16	2,00	2,10	1,75	0,30	0,30	0,00	0,00
17	2,30	1,90	1,80	0,30	0,30	0,00	0,00
18	2,30	2,50	2,10	0,30	0,30	0,00	0,00
19	1,90	2,00	1,65	0,30	0,30	0,00	0,00
20	2,10	1,80	1,65	0,30	0,30	0,00	0,00
21	2,50	2,50	2,20	0,90	1,10	0,70	33,25
22	1,20	1,50	1,05	0,30	0,30	0,00	0,00
23	2,60	2,90	2,45	0,30	0,30	0,00	0,00
24	2,80	3,00	2,60	0,30	0,30	0,00	0,00

25	2,80	3,20	2,70	0,30	0,30	0,00	0,00
26	2,90	2,70	2,50	0,30	0,30	0,00	0,00
27	2,80	2,70	2,45	0,30	0,30	0,00	0,00
28	2,60	2,80	2,40	0,30	0,30	0,00	0,00
29	2,50	2,50	2,20	0,30	0,30	0,00	0,00
30	2,60	2,60	2,30	0,30	0,30	0,00	0,00
Promedio de promedios		2,11		% incidencia			86,67

○ M4

Nº de herida	Control			C.I.M x ½ (1,5 µM)			
	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	% severidad
1	1,90	1,80	1,55	2,60	2,60	2,30	109,26
2	1,90	2,00	1,65	2,30	2,90	2,30	109,26
3	2,50	2,30	2,10	2,60	3,00	2,50	118,76
4	2,80	2,60	2,40	2,00	2,10	1,75	83,14
5	2,00	2,10	1,75	2,00	2,10	1,75	83,14
6	2,60	2,30	2,15	0,30	0,30	0,00	0,00
7	2,30	2,70	2,20	2,50	2,80	2,35	111,64
8	2,30	2,40	2,05	2,50	2,40	2,15	102,14
9	2,80	2,40	2,30	2,30	2,40	2,05	97,39
10	2,40	2,40	2,10	2,60	2,70	2,35	111,64
11	3,00	3,00	2,70	1,90	2,50	1,90	90,26
12	2,80	2,70	2,45	1,70	2,50	1,80	85,51
13	2,10	2,30	1,90	2,50	2,30	2,10	99,76
14	1,90	1,80	1,55	2,60	2,70	2,35	111,64
15	2,90	2,70	2,50	1,70	2,10	1,60	76,01
16	2,00	2,10	1,75	2,40	2,70	2,25	106,89
17	2,30	1,90	1,80	2,20	2,30	1,95	92,64
18	2,30	2,50	2,10	2,00	2,30	1,85	87,89
19	1,90	2,00	1,65	2,20	2,30	1,95	92,64
20	2,10	1,80	1,65	2,30	2,50	2,10	99,76
21	2,50	2,50	2,20	2,50	2,10	2,00	95,01
22	1,20	1,50	1,05	2,40	2,80	2,30	109,26
23	2,60	2,90	2,45	0,30	0,30	0,00	0,00
24	2,80	3,00	2,60	2,50	2,50	2,20	104,51
25	2,80	3,20	2,70	2,00	2,80	2,10	99,76
26	2,90	2,70	2,50	2,00	2,00	1,70	80,76

27	2,80	2,70	2,45	2,20	2,40	2,00	95,01
28	2,60	2,80	2,40	2,30	2,50	2,10	99,76
29	2,50	2,50	2,20	2,70	2,60	2,35	111,64
30	2,60	2,60	2,30	2,30	2,40	2,05	97,39
Promedio de promedios			2,11				

Nº de herida	Control			C.I.M x 1 (3 µM)			
	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	% severidad
1	1,90	1,80	1,55	1,90	1,60	1,45	68,88
2	1,90	2,00	1,65	2,00	1,90	1,65	78,38
3	2,50	2,30	2,10	2,10	2,20	1,85	87,89
4	2,80	2,60	2,40	2,20	2,40	2,00	95,01
5	2,00	2,10	1,75	2,20	2,30	1,95	92,64
6	2,60	2,30	2,15	2,90	3,70	3,00	142,52
7	2,30	2,70	2,20	3,00	2,60	2,50	118,76
8	2,30	2,40	2,05	2,90	2,70	2,50	118,76
9	2,80	2,40	2,30	3,20	2,70	2,65	125,89
10	2,40	2,40	2,10	3,10	2,70	2,60	123,52
11	3,00	3,00	2,70	2,80	3,20	2,70	128,27
12	2,80	2,70	2,45	3,00	3,00	2,70	128,27
13	2,10	2,30	1,90	4,00	3,10	3,25	154,39
14	1,90	1,80	1,55	2,40	2,70	2,25	106,89
15	2,90	2,70	2,50	2,20	2,70	2,15	102,14
16	2,00	2,10	1,75	2,90	3,20	2,75	130,64
17	2,30	1,90	1,80	2,50	3,20	2,55	121,14
18	2,30	2,50	2,10	2,60	2,90	2,45	116,39
19	1,90	2,00	1,65	2,80	2,90	2,55	121,14
20	2,10	1,80	1,65	2,30	2,60	2,15	102,14
21	2,50	2,50	2,20	2,80	2,90	2,55	121,14
22	1,20	1,50	1,05	2,50	2,80	2,35	111,64
23	2,60	2,90	2,45	2,40	2,70	2,25	106,89
24	2,80	3,00	2,60	2,50	3,00	2,45	116,39
25	2,80	3,20	2,70	3,00	3,50	2,95	140,14
26	2,90	2,70	2,50	2,70	2,10	2,10	99,76
27	2,80	2,70	2,45	2,70	2,70	2,40	114,01
28	2,60	2,80	2,40	2,50	2,70	2,30	109,26
29	2,50	2,50	2,20	2,80	2,90	2,55	121,14
30	2,60	2,60	2,30	3,10	3,20	2,85	135,39
Promedio de promedios			2,11				

Extractos

Las condiciones de este ensayo fueron 30 días a 0-1 °C.

Control: Manzanas inoculado con 10 µL de suspensión de esporas *Botrytis cinerea* concentración 1×10^4 espora/mL. En cada condición se le agrego 10 µL de extracto y luego 10 µL de suspensión de esporas *Botrytis cinerea* concentración 1×10^4 espora/mL.

Nº de herida	Control			TRX			
	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	% severidad
1	1,90	1,80	1,55	0,30	0,30	0,00	0,00
2	1,90	2,00	1,65	0,50	0,60	0,25	11,88
3	2,50	2,30	2,10	0,70	0,70	0,40	19,00
4	2,80	2,60	2,40	1,00	1,20	0,80	38,00
5	2,00	2,10	1,75	0,90	1,40	0,85	40,38
6	2,60	2,30	2,15	2,80	2,50	2,35	111,64
7	2,30	2,70	2,20	2,50	2,30	2,10	99,76
8	2,30	2,40	2,05	1,10	0,90	0,70	33,25
9	2,80	2,40	2,30	2,30	2,00	1,85	87,89
10	2,40	2,40	2,10	2,70	2,40	2,25	106,89
11	3,00	3,00	2,70	2,70	2,60	2,35	111,64
12	2,80	2,70	2,45	3,00	2,50	2,45	116,39
13	2,10	2,30	1,90	2,40	2,20	2,00	95,01
14	1,90	1,80	1,55	2,00	2,00	1,70	80,76
15	2,90	2,70	2,50	1,20	1,30	0,95	45,13
16	2,00	2,10	1,75	1,50	1,50	1,20	57,01
17	2,30	1,90	1,80	1,60	1,70	1,35	64,13
18	2,30	2,50	2,10	1,30	1,30	1,00	47,51
19	1,90	2,00	1,65	0,30	0,30	0,00	0,00
20	2,10	1,80	1,65	2,10	1,80	1,65	78,38
21	2,50	2,50	2,20	2,40	2,40	2,10	99,76
22	1,20	1,50	1,05	2,00	2,00	1,70	80,76
23	2,60	2,90	2,45	1,00	1,30	0,85	40,38
24	2,80	3,00	2,60	1,90	2,10	1,70	80,76
25	2,80	3,20	2,70	2,30	2,70	2,20	104,51
26	2,90	2,70	2,50	1,70	1,70	1,40	66,51
27	2,80	2,70	2,45	2,20	2,10	1,85	87,89
28	2,60	2,80	2,40	1,90	1,50	1,40	66,51
29	2,50	2,50	2,20	2,30	2,20	1,95	92,64
30	2,60	2,60	2,30	1,60	1,60	1,30	61,76

Nº de herida	Control			P11			
	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	% severidad
1	1,90	1,80	1,55	3,50	3,00	2,95	140,14
2	1,90	2,00	1,65	2,80	3,20	2,70	128,27
3	2,50	2,30	2,10	2,50	3,00	2,45	116,39
4	2,80	2,60	2,40	3,20	3,00	2,80	133,02
5	2,00	2,10	1,75	2,50	2,80	2,35	111,64
6	2,60	2,30	2,15	3,00	3,20	2,80	133,02
7	2,30	2,70	2,20	3,10	3,50	3,00	142,52
8	2,30	2,40	2,05	3,00	2,80	2,60	123,52
9	2,80	2,40	2,30	2,70	2,60	2,35	111,64
10	2,40	2,40	2,10	2,00	1,90	1,65	78,38
11	3,00	3,00	2,70	2,90	2,00	2,15	102,14
12	2,80	2,70	2,45	2,70	2,40	2,25	106,89
13	2,10	2,30	1,90	3,30	3,00	2,85	135,39
14	1,90	1,80	1,55	3,30	3,50	3,10	147,27
15	2,90	2,70	2,50	3,40	3,80	3,30	156,77
16	2,00	2,10	1,75	2,00	1,90	1,65	78,38
17	2,30	1,90	1,80	2,00	2,00	1,70	80,76
18	2,30	2,50	2,10	2,40	2,60	2,20	104,51
19	1,90	2,00	1,65	2,50	2,50	2,20	104,51
20	2,10	1,80	1,65	2,50	2,10	2,00	95,01
21	2,50	2,50	2,20	2,40	2,50	2,15	102,14
22	1,20	1,50	1,05	2,20	2,10	1,85	87,89
23	2,60	2,90	2,45	1,00	1,80	1,10	52,26
24	2,80	3,00	2,60	0,30	0,30	0,00	0,00
25	2,80	3,20	2,70	1,10	1,10	0,80	38,00
26	2,90	2,70	2,50	1,90	1,60	1,45	68,88
27	2,80	2,70	2,45	2,40	2,20	2,00	95,01
28	2,60	2,80	2,40	2,70	2,50	2,30	109,26
29	2,50	2,50	2,20	2,40	2,30	2,05	97,39
30	2,60	2,60	2,30	2,40	2,40	2,10	99,76
Promedio de promedios			2,11				

	Control			M4			
Nº de herida	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	% severidad
1	1,90	1,80	1,55	0,30	0,30	0,00	0,00
2	1,90	2,00	1,65	0,40	0,50	0,15	7,13
3	2,50	2,30	2,10	1,80	1,10	1,15	54,63
4	2,80	2,60	2,40	0,90	0,70	0,50	23,75
5	2,00	2,10	1,75	0,70	0,60	0,35	16,63
6	2,60	2,30	2,15	0,30	0,30	0,00	0,00
7	2,30	2,70	2,20	0,60	0,50	0,25	11,88
8	2,30	2,40	2,05	0,70	0,90	0,50	23,75
9	2,80	2,40	2,30	1,20	1,10	0,85	40,38
10	2,40	2,40	2,10	0,30	0,30	0,00	0,00
11	3,00	3,00	2,70	0,30	0,30	0,00	0,00
12	2,80	2,70	2,45	0,30	0,30	0,00	0,00
13	2,10	2,30	1,90	0,80	0,60	0,40	19,00
14	1,90	1,80	1,55	1,00	0,80	0,60	28,50
15	2,90	2,70	2,50	0,30	0,30	0,00	0,00
16	2,00	2,10	1,75	0,30	0,30	0,00	0,00
17	2,30	1,90	1,80	0,30	0,30	0,00	0,00
18	2,30	2,50	2,10	0,30	0,30	0,00	0,00
19	1,90	2,00	1,65	0,30	0,30	0,00	0,00
20	2,10	1,80	1,65	0,30	0,30	0,00	0,00
21	2,50	2,50	2,20	0,30	0,30	0,00	0,00
22	1,20	1,50	1,05	1,00	0,90	0,65	30,88
23	2,60	2,90	2,45	0,30	0,30	0,00	0,00
24	2,80	3,00	2,60	0,50	0,70	0,30	14,25
25	2,80	3,20	2,70	0,30	0,30	0,00	0,00
26	2,90	2,70	2,50	1,50	1,50	1,20	57,01
27	2,80	2,70	2,45	0,30	0,30	0,00	0,00
28	2,60	2,80	2,40	1,60	1,40	1,20	57,01
29	2,50	2,50	2,20	1,20	1,00	0,80	38,00
30	2,60	2,60	2,30	0,90	0,90	0,60	28,50
	Promedio de promedios	2,11			%incidencia		50,00

12.2.2 *Penicillium expansum*

Extractos

Las condiciones de este ensayo fueron 30 días a 0-1 °C.

Control: Manzanas inoculado con 10 µL de suspensión de esporas *Penicillium expansum* concentración 1×10^4 espora/mL. En cada condición se le agrego 10 µL de extracto y luego 10 µL de suspensión de esporas *Penicillium expansum* concentración 1×10^4 espora/mL.

Nº de herida	Control			TRX			
	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	% severidad
1	2,60	2,50	2,25	2,10	2,10	1,80	84,84
2	2,60	2,70	2,35	1,70	1,70	1,40	65,99
3	2,50	2,40	2,15	2,30	2,20	1,95	91,91
4	2,70	2,50	2,30	2,50	2,40	2,15	101,34
5	2,50	2,60	2,25	2,50	2,50	2,20	103,69
6	2,40	2,40	2,10	2,20	2,10	1,85	87,20
7	2,50	2,50	2,20	2,10	2,10	1,80	84,84
8	2,80	2,50	2,35	2,30	2,00	1,85	87,20
9	2,50	2,50	2,20	2,60	2,30	2,15	101,34
10	2,50	2,20	2,05	2,70	2,30	2,20	103,69
11	2,70	2,40	2,25	1,20	1,20	0,90	42,42
12	2,40	2,20	2,00	2,30	2,00	1,85	87,20
13	2,40	2,30	2,05	1,20	1,60	1,10	51,85
14	2,60	2,20	2,10	2,40	2,20	2,00	94,27
15	2,70	2,40	2,25	1,90	1,90	1,60	75,41
16	2,50	2,50	2,20	2,90	2,50	2,40	113,12
17	2,50	2,30	2,10	2,90	2,50	2,40	113,12
18	2,50	2,20	2,05	3,00	3,00	2,70	127,26
19	1,70	1,40	1,25	2,80	2,30	2,25	106,05
20	2,20	2,10	1,85	3,00	2,50	2,45	115,48
21	2,80	2,50	2,35	2,60	2,40	2,20	103,69
22	2,60	2,40	2,20	2,80	2,70	2,45	115,48
23	1,70	1,60	1,35	2,50	2,30	2,10	98,98
24	2,50	2,60	2,25	2,50	2,30	2,10	98,98
25	2,60	2,60	2,30	2,30	2,10	1,90	89,55
26	2,30	2,40	2,05	2,50	2,20	2,05	96,62
27	2,70	2,50	2,30	2,70	2,50	2,30	108,41

28	2,80	2,60	2,40	2,60	2,50	2,25	106,05
29	2,60	2,50	2,25	2,50	2,40	2,15	101,34
30	2,30	2,10	1,90	2,30	2,40	2,05	96,62
	Promedio de promedios	2,12					

Nº de herida	Control			P11			
	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	% severidad
1	2,60	2,50	2,25	2,20	1,60	1,60	75,41
2	2,60	2,70	2,35	2,80	2,40	2,30	108,41
3	2,50	2,40	2,15	2,70	2,50	2,30	108,41
4	2,70	2,50	2,30	2,20	2,00	1,80	84,84
5	2,50	2,60	2,25	2,70	2,30	2,20	103,69
6	2,40	2,40	2,10	2,50	2,30	2,10	98,98
7	2,50	2,50	2,20	2,50	2,20	2,05	96,62
8	2,80	2,50	2,35	2,00	1,90	1,65	77,77
9	2,50	2,50	2,20	2,20	2,00	1,80	84,84
10	2,50	2,20	2,05	2,70	2,50	2,30	108,41
11	2,70	2,40	2,25	2,30	2,10	1,90	89,55
12	2,40	2,20	2,00	2,50	2,40	2,15	101,34
13	2,40	2,30	2,05	2,40	2,30	2,05	96,62
14	2,60	2,20	2,10	2,50	2,20	2,05	96,62
15	2,70	2,40	2,25	2,60	2,50	2,25	106,05
16	2,50	2,50	2,20	1,90	1,80	1,55	73,06
17	2,50	2,30	2,10	2,50	2,20	2,05	96,62
18	2,50	2,20	2,05	2,30	2,10	1,90	89,55
19	1,70	1,40	1,25	2,20	2,00	1,80	84,84
20	2,20	2,10	1,85	2,50	2,20	2,05	96,62
21	2,80	2,50	2,35	1,90	1,80	1,55	73,06
22	2,60	2,40	2,20	2,30	2,10	1,90	89,55
23	1,70	1,60	1,35	2,40	2,00	1,90	89,55
24	2,50	2,60	2,25	2,30	2,10	1,90	89,55
25	2,60	2,60	2,30	2,10	2,10	1,80	84,84
26	2,30	2,40	2,05	1,80	1,80	1,50	70,70
27	2,70	2,50	2,30	2,20	2,00	1,80	84,84
28	2,80	2,60	2,40	2,50	2,30	2,10	98,98
29	2,60	2,50	2,25	2,70	2,20	2,15	101,34
30	2,30	2,10	1,90	2,50	2,30	2,10	98,98
	Promedio de promedios	2,12					

Nº de herida	Control			M4			
	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	medida horizontal (cm)	medida vertical (cm)	Promedio de medidas	% severidad
1	2,60	2,50	2,25	1,20	1,10	0,85	40,06
2	2,60	2,70	2,35	1,40	1,40	1,10	51,85
3	2,50	2,40	2,15	2,40	2,10	1,95	91,91
4	2,70	2,50	2,30	2,00	2,00	1,70	80,13
5	2,50	2,60	2,25	2,50	2,30	2,10	98,98
6	2,40	2,40	2,10	1,40	1,50	1,15	54,20
7	2,50	2,50	2,20	2,20	2,20	1,90	89,55
8	2,80	2,50	2,35	2,20	1,90	1,75	82,48
9	2,50	2,50	2,20	2,20	2,20	1,90	89,55
10	2,50	2,20	2,05	2,30	2,40	2,05	96,62
11	2,70	2,40	2,25	2,40	2,20	2,00	94,27
12	2,40	2,20	2,00	2,40	2,20	2,00	94,27
13	2,40	2,30	2,05	2,40	2,40	2,10	98,98
14	2,60	2,20	2,10	2,50	2,10	2,00	94,27
15	2,70	2,40	2,25	2,20	2,40	2,00	94,27
16	2,50	2,50	2,20	2,70	2,40	2,25	106,05
17	2,50	2,30	2,10	2,20	2,30	1,95	91,91
18	2,50	2,20	2,05	2,80	2,60	2,40	113,12
19	1,70	1,40	1,25	3,00	2,80	2,60	122,55
20	2,20	2,10	1,85	2,70	2,30	2,20	103,69
21	2,80	2,50	2,35	1,90	2,20	1,75	82,48
22	2,60	2,40	2,20	2,10	2,10	1,80	84,84
23	1,70	1,60	1,35	2,40	2,00	1,90	89,55
24	2,50	2,60	2,25	2,10	2,50	2,00	94,27
25	2,60	2,60	2,30	2,70	2,40	2,25	106,05
26	2,30	2,40	2,05	1,70	1,90	1,50	70,70
27	2,70	2,50	2,30	2,60	2,50	2,25	106,05
28	2,80	2,60	2,40	2,50	2,40	2,15	101,34
29	2,60	2,50	2,25	2,50	2,70	2,30	108,41
30	2,30	2,10	1,90	2,20	2,40	2,00	94,27
	Promedio de promedios		2,12				

13. Anexo 3

En este anexo se adjuntan los resultados obtenidos, del ensayo de *screening* y la determinación de concentración inhibitoria mínima.

13.1 *Screening*

13.1.1 *Botrytis cinerea*

Resultados de % de inhibición

Medidas de Absorbancia a 600 nm													% de inhibición																			
<i>B. cinerea</i> 72 hs con tapa Replica 1													Prom Ctes																			
PORCENTAJE de defensinas en el total de volumen (100uL)													Turbides		0,682875		P3		P10		P11		P13		M4		M6		E32		TRX	
	30	0,26	0,305	0,56	0,192	0,4	0,434	0,449	0,098	0,465	0,099	0,096	Turbides		0,099375		76	70	32	86	56	51	49	100								
	15	0,302	0,602	0,443	0,162	0,43	0,318	0,349	0,455	0,803	0,122	0,09	CSM		0,099875		74	30	53	94	55	71	67	51								
	7,5	0,538	0,639	0,387	0,206	0,408	0,392	0,326	0,361	0,791	0,111	0,105					37	23	60	86	57	59	69	63								
	3,75	0,459	0,515	0,351	0,482	0,572	0,618	0,514	0,4	0,605	0,103	0,107			48		40	64	44	31	25	40	57									
	1,88	0,481	0,502	0,481	0,495	0,602	0,534	0,468	0,452	0,688	0,103	0,117			45		42	45	43	27	37	47	49									
	0,94	0,516	0,494	0,455	0,445	0,516	0,551	0,464	0,562	0,654	0,086	0,106			37		40	46	47	37	32	45	30									
	0,47	0,659	0,586	0,473	0,473	0,517	0,534	0,49	0,648	0,685	0,088	0,092			16		27	44	44	37	35	41	18									
	0,235	1,035	0,861	0,62	0,667	0,581	0,599	0,608	0,747	0,772	0,083	0,086			-39		-14	21	14	27	24	23	3									
<i>B. cinerea</i> 72 hs con tapa Replica 2													Prom Ctes																			
PORCENTAJE de defensinas en el total de volumen (100uL)													Turbides		0,742875		P3		P10		P11		P13		M4		M6		E32		TRX	
	30	0,324	0,229	0,612	0,181	0,412	0,433	0,262	0,103	0,69	0,104	0,087	Turbides		0,109625		71	84	32	90	59	56	79	101								
	15	0,233	0,433	0,509	0,127	0,467	0,321	0,296	0,522	0,992	0,137	0,078	CSM		0,0825		83	56	46	98	52	72	75	44								
	7,5	0,441	0,552	0,331	0,359	0,358	0,422	0,473	0,421	0,714	0,127	0,078			55		40	70	66	67	58	51	58									
	3,75	0,45	0,508	0,476	0,491	0,545	0,424	0,423	0,377	0,662	0,113	0,078			54		46	51	49	41	58	58	64									
	1,88	0,459	0,476	0,48	0,497	0,61	0,518	0,419	0,437	0,67	0,116	0,086			53		51	50	48	33	45	58	56									
	0,94	0,469	0,48	0,444	0,441	0,534	0,553	0,398	0,435	0,697	0,107	0,087			52		50	55	55	43	40	61	56									
	0,47	0,508	0,524	0,454	0,443	0,477	0,48	0,446	0,575	0,737	0,086	0,083			46		44	54	55	51	50	55	37									
	0,235	0,736	0,715	0,537	0,475	0,458	0,553	0,454	0,734	0,781	0,087	0,083			16		19	42	51	53	40	54	16									
<i>B. cinerea</i> 72 hs con tapa Replica 3													Prom Ctes																			
PORCENTAJE de defensinas en el total de volumen (100uL)													Turbides		0,905		P3		P10		P11		P13		M4		M6		E32		TRX	
	30	0,45	0,626	0,556	0,329	0,388	0,479	0,264	0,14	1,171	0,156	0,086	Turbides		0,121625		64	44	52	77	71	61	84	98								
	15	0,505	0,328	0,207	0,225	0,279	0,331	0,26	0,126	0,944	0,139	0,086	CSM		0,083375		58	77	91	89	83	77	85	100								
	7,5	0,527	0,337	0,314	0,231	0,331	0,403	0,553	0,407	0,886	0,149	0,084			55		76	79	88	77	69	52	68									
	3,75	0,743	0,43	0,461	0,503	0,534	0,482	0,398	0,333	0,835	0,139	0,078			31		66	63	58	54	60	69	77									
	1,88	0,848	0,386	0,43	0,49	0,525	0,46	0,354	0,36	0,866	0,109	0,089			20		71	66	59	55	63	74	74									
	0,94	0,852	0,411	0,367	0,387	0,335	0,398	0,37	0,45	0,803	0,106	0,082			19		68	73	71	76	69	73	64									
	0,47	0,909	0,47	0,365	0,374	0,401	0,416	0,37	0,502	0,868	0,089	0,081			13		62	73	72	69	67	73	58									
	0,235	1,001	0,736	0,627	0,604	0,478	0,509	0,536	0,838	0,867	0,086	0,081			3		32	44	47	61	57	54	21									

Resultados de Observación directa (i= inhibio, N.I= no inhibio)

<i>B.cinerea</i> Replica 1	PORCENTAJE de defensinas en el total de volumen (100uL)	P3	P10	P11	P13	M4	M6	E32	E102	TRX
		30	I	I	I	I	I	I	I	I
	15	I	I	I	I	I	I	I	I	I
	7,5	N.I	N.I	I	I	I	I	I	I	I
	3,75	N.I	N.I	I	I	I	I	I	N.I	N.I
	1,88	N.I	N.I	I	I	I	I	I	N.I	N.I
	0,94	N.I	N.I	I	I	I	I	I	N.I	N.I
	0,47	N.I	N.I	N.I	I	N.I	I	N.I	N.I	N.I
	0,235	N.I	N.I							
<i>B.cinerea</i> Replica 2	PORCENTAJE de defensinas en el total de volumen (100uL)	P3	P10	P11	P13	M4	M6	E32	E102	TRX
		30	I	I	I	I	I	I	I	I
	15	I	I	I	I	I	I	I	I	N.I
	7,5	N.I	I	I	I	I	I	I	I	N.I
	3,75	N.I	I	I	I	I	I	I	I	N.I
	1,88	N.I	N.I	I	I	I	I	I	N.I	N.I
	0,94	N.I	N.I	I	I	I	I	I	N.I	N.I
	0,47	N.I	N.I	I	I	I	I	I	N.I	N.I
	0,235	N.I	N.I							
<i>B.cinerea</i> Replica 3	PORCENTAJE de defensinas en el total de volumen (100uL)	P3	P10	P11	P13	M4	M6	E32	E102	TRX
		30	I	I	I	I	I	I	I	I
	15	N.I	I	I	I	I	I	I	I	I
	7,5	N.I	I	I	I	I	N.I	N.I	N.I	I
	3,75	N.I	I	I	I	I	I	N.I	N.I	I
	1,88	N.I	I	I	I	I	I	N.I	N.I	N.I
	0,94	N.I	N.I	I	I	I	I	N.I	N.I	N.I
	0,47	N.I	N.I	I	I	I	N.I	N.I	N.I	N.I
	0,235	N.I	N.I							

13.1.2 *Penicillium expansum*

Resultados de % de inhibición

Medidas de Absorbancia a 600 nm														% de inhibición											
P.expansum 72h con tapa Replica 1														Prom Cties											
PORCENTAJE de defensinas en el total de volumen (100uL)	P3	P10	P11	P13	M4	M6	E32	TRX	CC	Turb TRX	CSM	CC	0,92087	P3	P10	P11	P13	M4	M6	E32	TRX				
	30	0,563	0,234	0,822	0,405	0,566	0,561	0,307	0,874	1,312	0,535	0,08	Turbides (0,3195	74	109	45	91	73	74	101	40			
	15	0,542	0,28	0,272	0,456	0,563	0,52	0,391	0,467	0,873	0,418	0,078	CSM	0,0805	76	104	105	85	74	78	92	84			
	7,5	0,531	0,422	0,411	0,58	0,568	0,55	0,493	0,483	0,884	0,448	0,079			77	89	90	72	73	75	81	82			
	3,75	0,538	0,471	0,49	0,568	0,524	0,621	0,476	0,598	0,701	0,343	0,08			76	84	81	73	78	67	83	70			
	1,88	1,09	0,506	0,558	0,648	0,613	0,608	0,491	0,549	0,816	0,276	0,083			16	80	74	64	68	69	81	75			
	0,94	1,139	0,887	0,995	0,792	0,53	0,768	0,482	0,642	0,943	0,214	0,081			11	38	27	49	77	51	82	65			
	0,47	0,88	0,91	0,774	0,755	0,737	0,767	0,622	0,791	0,834	0,18	0,081			39	36	51	53	55	51	67	49			
	0,235	1,166	0,91	0,999	0,744	0,682	0,878	0,822	0,87	1,004	0,142	0,082			8	36	26	54	61	39	45	40			
P.expansum 72h con tapa Replica 2														Prom Cties											
PORCENTAJE de defensinas en el total de volumen (100uL)	P3	P10	P11	P13	M4	M6	E32	TRX	CC	Turb TRX	CSM	CC	1,32612	P3	P10	P11	P13	M4	M6	E32	TRX				
	30	0,634	0,742	0,422	0,854	0,454	0,459	0,273	0,154	1,487	0,147	0,091	Turbides (0,13425	62	54	78	46	76	76	90	99			
	15	0,727	0,738	0,521	0,667	0,527	0,62	0,506	0,994	1,566	0,138	0,087	CSM	0,086	55	54	71	60	70	63	72	35			
	7,5	0,937	0,797	0,649	0,813	0,767	0,834	0,487	0,932	1,41	0,139	0,082			39	50	61	49	52	47	73	40			
	3,75	0,937	1,062	0,855	0,973	0,865	0,923	0,844	0,881	1,227	0,131	0,084			39	30	46	37	45	41	46	44			
	1,88	1,271	1,006	0,939	1,042	0,884	0,983	0,864	0,836	1,178	0,142	0,086			14	34	39	32	43	36	45	47			
	0,94	1,53	1,007	0,969	1,039	0,895	0,967	0,879	1,121	1,191	0,138	0,086			-5	34	37	32	43	37	44	26			
	0,47	1,594	1,2	1,006	1,052	0,902	0,967	0,957	1,371	1,308	0,119	0,084			-10	20	34	31	42	37	38	7			
	0,235	1,554	1,523	1,027	1,234	1,044	1,131	1,266	1,385	1,242	0,12	0,088			-7	-5	33	17	31	25	15	6			
P.expansum 72h con tapa Replica 3														Prom Cties											
PORCENTAJE de defensinas en el total de volumen (100uL)	P3	P10	P11	P13	M4	M6	E32	TRX	CC	Turb TRX	CSM	CC	1,33287	P3	P10	P11	P13	M4	M6	E32	TRX				
	30	0,483	0,649	0,492	0,573	0,39	0,46	0,26	0,181	1,802	0,159	0,105	Turbides (0,13437	74	61	73	67	81	76	91	97			
	15	1,018	0,745	0,48	0,558	0,542	0,67	0,447	0,634	1,519	0,138	0,087	CSM	0,08762	34	54	74	68	69	60	77	63			
	7,5	1,31	1,137	0,803	1,066	0,985	0,865	0,637	0,822	1,343	0,135	0,086			12	25	50	30	36	45	62	48			
	3,75	1,5	1,068	0,859	0,993	0,997	1,01	0,91	0,91	1,231	0,139	0,084			-2	30	46	36	35	34	42	42			
	1,88	1,603	1,078	0,97	0,959	0,917	0,931	0,872	0,873	1,204	0,147	0,085			-10	29	37	38	41	40	45	45			
	0,94	1,283	1,209	1,007	0,991	0,892	0,945	0,878	1,012	1,175	0,131	0,083			14	19	35	36	43	39	44	34			
	0,47	1,391	1,486	0,95	1,586	1,484	1,035	0,896	1,35	1,088	0,112	0,082			6	-1	39	-9	-1	32	43	9			
	0,235	1,454	1,474	1,192	1,463	1,59	1,485	1,517	1,594	1,301	0,114	0,089			1	-1	21	0	-9	-1	-4	-10			

Resultados de Observación directa (i= inhibio, N.I= no inhibio)

P.expansum Replica 1		PORCENTAJE de defensinas en el total de volumen (100uL)												P3	P10	P11	P13	M4	M6	E32	TRX	
														30	I	I	I	I	I	I	II	
														15	I	I	I	I	I	I	I	
														7,5	I	I	I	I	I	I	I	
														3,75	I	I	I	I	I	I	I	
														1,88	,N.I	I	I	,N.I	I	I	I	,N.I
														0,94	,N.I	,N.I	,N.I	,N.I	I	,N.I	I	,N.I

		0,47	,N.I							
		0,235	,N.I							
<i>P. expansum</i> Replica 2	PORCENTAJE de defensinas en el total de volumen (100uL)		P3	P10	P11	P13	M4	M6	E32	TRX
		30	I	I	I	I	I	I	I	I
		15	I	I	I	I	I	I	I	'N.I
		7,5	'N.I	I	I	I	I	I	I	'N.I
		3,75	'N.I	'N.I	I	I	I	I	I	'N.I
		1,88	'N.I	'N.I	I	'N.I	I	'N.I	I	'N.I
		0,94	'N.I	'N.I	I	'N.I	'N.I	'N.I	I	'N.I
		0,47	'N.I	'N.I	I	'N.I	'N.I	'N.I	'N.I	'N.I
		0,235	'N.I							
<i>P. expansum</i> Replica 3	PORCENTAJE de defensinas en el total de volumen (100uL)		P3	P10	P11	P13	M4	M6	E32	TRX
		30	I	I	I	I	I	I	I	I
		15	'N.I	I	I	I	I	I	I	I
		7,5	'N.I	'N.I	I	I	'N.I	I	I	'N.I
		3,75	'N.I	'N.I	I	'N.I	'N.I	'N.I	I	'N.I
		1,88	'N.I	'N.I	I	'N.I	'N.I	'N.I	I	'N.I
		0,94	'N.I							
		0,47	'N.I							
		0,235	'N.I							

13.2 Concentración inhibitoria Mínima (MIC)

13.2.1 *Botrytis cinerea*

B.cinerea 72 h Replica 1				Digeridos						Prom Ciles	% de actividad	Digeridos	
Concentración (uM) de defensinas en el total de volumen (100uL)				Concentración de propiconasol en el vol total (uM)						PdDf11	MiDf4		
	PdDf11	MiDf4	CC	Propi	CSM							PdDf11	MiDf4
	12	0,089	0,109	0,571	130	0,112	0,111	CC	0,513625	104	99		
	6	0,104	0,11	0,406	65	0,112	0,116	CSM	0,103625	100	98		
	3	0,25	0,129	0,397	32,5	0,107	0,109	Resta	0,41	64	94		
	1,5	0,292	0,195	0,464	16,25	0,187	0,106			54	78		
	0,75	0,331	0,295	0,43	8,125	0,262	0,104			45	53		
	0,375	0,286	0,24	0,336	4,0625	0,252	0,104			56	67		
	0,1875	0,589	0,467	0,563	2,03125	0,389	0,091			0	11		
	0,09375	1,244	1,045	0,942	1,015625	0,881	0,088			0	0		
B.cinerea 72 h Replica 2				Digeridos						Prom Ciles	% de actividad	Digeridos	
Concentración (uM) de defensinas en el total de volumen (100uL)	PdDf11	MiDf4	Propi	CC	CSM					PdDf11	MiDf4		
	12	0,131	0,114	0,626	0,09	CC	0,609375				95		
	6	0,148	0,134	0,129	0,562	0,109	CSM	0,10825		92	95		
	3	0,251	0,154	0,13	0,57	0,115	Resta	0,501125		72	91		
	1,5	0,311	0,189	0,189	0,592	0,118				60	84		
	0,75	0,457	0,268	0,242	0,534	0,113				30	68		
	0,375	0,475	0,358	0,311	0,586	0,111				27	50		
	0,1875	0,514	0,42	0,346	0,485	0,116				19	38		
	0,09375	0,598	0,584	0,579	0,92	0,094				0	5		
Promedios				Desvio estandar									
PdDf11	MiDf4			PdDf11	MiDf4								
	97				2,2831								
96	97				5,5442	2,5340							
68	92				5,1020	2,0792							
57	81				3,8793	4,3649							
37	61				9,9957	10,464							
41	58				20,2965	11,720							
10	25				13,4578	18,680							
0	3				0,0000	3,5805							

13.2.2 *Penicillium expansum*

<i>P. expansum</i> replica 1		Digeridos			Concentración de propiconasol en el vol total (uM)			Prom Cties	% de actividad	Digeridos	
Concentración (uM) de defensinas en el total de volumen (100uL)		PdDf11	MiDf4	CC	Propi	CSM				PdDf11	MiDf4
12	0,13	0,232	0,593		130	0,083	0,083	CC	0,469	87,7386	61,3394
6	0,244	0,254	0,389		65	0,083	0,078	CSM	0,082625	58,2336	55,6454
3	0,344	0,297	0,408		32,5	0,09	0,08	Resta	0,386375	32,3520	44,5163
1,5	0,405	0,422	0,433		16,25	0,106	0,08			16,5642	12,1643
0,75	0,433	0,491	0,425		8,125	0,108	0,085			9,3174	0,0000
0,375	0,495	0,49	0,459		4,0625	0,114	0,085			0,0000	0,0000
0,1875	0,524	0,479	0,43		2,03125	0,146	0,083			0,0000	0,0000
0,09375	0,811	0,607	0,615		1,015625	0,413	0,087			0,0000	0,0000
<i>P. expansum</i> replica 2		Digeridos						Prom Cties	% de actividad	Digeridos	
Concentración (uM) de defensinas en el total de volumen (100uL)		PdDf11	MiDf4	Propi	CC	CSM				PdDf11	MiDf4
12	0	0,184	0,084		0,816	0,08	CC	0,64875		82,0207	
6	0,304	0,312	0,092		0,573	0,083	CSM	0,082125	60,8427	59,4308	
3	0,367	0,418	0,087		0,596	0,083	Resta	0,566625	49,7242	40,7236	
1,5	0,63	0,592	0,085		0,603	0,085			3,3091	10,0154	
0,75	0,667	0,771	0,084		0,583	0,081			0,0000	0,0000	
0,375	0,598	0,721	0,083		0,584	0,082			8,9565	0,0000	
0,1875	0,642	0,716	0,386		0,633	0,082			1,1913	0,0000	
0,09375	0,698	0,846	0,256		0,802	0,081			0,0000	0,0000	
Promedios			Desv. estandar								
	PdDf11	MiDf4		PdDf11	MiDf4						
	87,7386	71,680			14,623						
	59,5381	57,538			1,8449	2,6767					
	41,0381	42,620			12,2840	2,6819					
	9,9366	11,089			9,3728	1,5195					
	4,6587	0,0000			6,5884	0,0000					
	4,4783	0,0000			6,3332	0,0000					
	0,5956	0,0000			0,8424	0,0000					
	0,0000	0,0000			0,0000	0,0000					