

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

**CARACTERIZACIÓN METABOLÓMICA DE GENOTIPOS DE
CALABAZA RESISTENTES A DAMPING OFF**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

Presenta:

GERARDO ABUNDEZ CASTREJÓN

Bajo la supervisión de:

Dr. CLEMENTE VILLANUEVA VERDUZCO



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



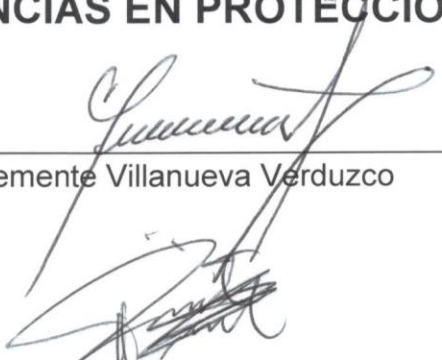
Chapingo, Estado de México, Junio de 2019

CARACTERIZACIÓN METABOLÓMICA DE GENOTIPOS DE CALABAZA RESISTENTES A DAMPING OFF

Tesis realizada por el I. A. F. GERARDO ABUNDEZ CASTREJÓN bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

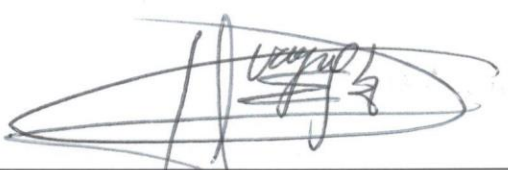
DIRECTOR:


Dr. Clemente Villanueva Verduzco

ASESOR:


M. C. José Enrique Herbert Pucheta

ASESOR:


Dr. Mateo Vargas Hernández

ASESOR:


Dr. Marcelo Acosta Ramos

CONTENIDO

DEDICATORIAS.....	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
RESUMEN GENERAL	x
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	12
1.1 Objetivos	14
1.1 Objetivos específicos	14
1.2 Hipótesis	14
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
2.1 El cultivo de Calabaza (<i>Cucurbita</i> spp.)	15
2.1.1 Importancia	16
2.1.2 Diferencias morfológicas entre especies cultivadas.....	17
2.2 Damping Off.....	19
2.2.1 Control de Damping off	20
2.3 Metabolómica	20
2.4 El metaboloma de las plantas	22
2.4.1 Metabolitos primarios y especializados	23
2.5 La espectroscopía de Infra-Rojo Cercano (IRC) como método analítico	24
2.6 La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) como una técnica de análisis isotópica.....	26
2.6.1 Bases para el análisis de espectros RMN	27
2.7 El procesamiento de los datos.....	28
2.8 Análisis exploratorios o no dirigidos	29
2.8 Análisis multivariado clasificatorio	30
2.9 Perfilado metabólico para explorar el metabolismo primario y secundario de las plantas.....	31
Literatura citada	34
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1 Ubicación del área de estudio.....	38

3.2 Material Genético	38
3.3 Preparación de las muestras de extracto orgánico con cloroformo	38
3.4. Ensayo I. Espectroscopía de infrarrojo cercano (IRC) en muestras de semilla y extracto orgánico	41
3.5. Ensayo II. Pruebas de Resonancia Magnética Nuclear en muestras de semilla y extracto orgánico	41
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1 Ensayo I. Espectroscopía de IRC en muestras de semilla y extracto orgánico	43
4.2 Ensayo II. Pruebas de RMN en muestras de semilla y extracto orgánico	52
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	57

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Caracteres distintivos de las cinco especies cultivadas de Cucurbita	18
Cuadro 2. Relación de genotipos de calabaza utilizados.	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes frutos de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp.). Fuente: Robert, 2010	15
Figura 2. Comparación de la superficie cosechada y producción de calabaza en los últimos dos años según datos de la FAO (2019).....	16
Figura 3. Cuatro de las cinco especies cultivadas del género <i>Cucurbita</i> . a) <i>Cucurbita pepo</i> ; b) <i>Cucurbita argyrosperma</i> ; c) <i>Cucurbita ficifolia</i> y; d) <i>Cucurbita moschata</i>	17
Figura 4. Daño por Damping off en diferentes Cucurbitáceas.	19
Figura 5. La metabolómica y sus bases.....	21
Figura 6. El metabolismo de las plantas y sus funciones ecológicas adaptado de Deborde et al., 2017.	23
Figura 7 Localización del espectro de Infra-Rojo Cercano.....	25
Figura 8 Ejemplos de desplazamientos químicos y su interpretación.....	27
Figura 9. Metodología empleada para la extracción de muestras en solución orgánica (Cloroformo) a partir de semilla.....	40
Figura 10 Prueba de Espectrometría de IRC en muestras de semilla de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i> , <i>C. ficifolia</i> , <i>C. moschata</i> y <i>C. argyrosperma</i>)	44
Figura 11 Prueba de Espectroscopía de IRC en muestras de extracto orgánico a partir de semillas de calabaza <i>Cucurbita pepo</i> , <i>C. ficifolia</i> , <i>C. moschata</i> y <i>C. argyrosperma</i>).....	46
Figura 12 Primera derivada de las funciones obtenidas a partir de Espectroscopía de IRC en muestras de semilla de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i> , <i>C. ficifolia</i> , <i>C. moschata</i> y <i>C. argyrosperma</i>).....	48
Figura 13 Figura 13 Primera derivada de las funciones obtenidas a partir de Espectroscopía de IRC en muestras de extracto orgánico (CHCl ₃) de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i> , <i>C. ficifolia</i> , <i>C. moschata</i> y <i>C. argyrosperma</i>).	50

Figura 14 Porcentajes de ácidos grasos y proteína en semillas de calabaza, muestras de semilla y extracto orgánico.....	51
Figura 15 Espectro de ¹ H-RMN de extractos orgánicos de Cucurbita pepo, C. moschata, C. ficifolia, y C. argyrosperma. Región de 9.5-0.5 ppm	53
Figura 16 Espectro de ¹ H-RMN de extractos orgánicos de Cucurbita pepo, C. moschata, C. ficifolia, y C. argyrosperma. Expansión de regiones entre 8.5-5.5 ppm y 3.2-0.5 ppm (parte 1).....	54
Figura 17 Espectro de ¹ H-RMN de extractos orgánicos de Cucurbita pepo, C. moschata, C. ficifolia, y C. argyrosperma. Expansión de regiones entre 8.5-5.5 ppm y 3.2-0.5 ppm (parte 2).....	55

DEDICATORIAS

A mis padres, Sra. Juana Castrejón Contreras y Sr. Nemesio Abundez Castro; por ser los mejores padres del mundo, apoyarme siempre incondicionalmente y estar siempre en los momentos más difíciles.

A mis hermanos, Araceli, Federico, Fortunato y Timotea, por enseñarme que debemos tener siempre una actitud positiva ante las peores circunstancias y nunca rendirse.

A mis amigos, Camille, Mayra, Gustavo, Jennifer, Sandra, Jalil, Daniel, Roberto, Karim, Fernando, Carlos y todos los omitidos, por su amistad incondicional, son unas excelentes personas de las cuales he aprendido mucho.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por el apoyo económico proporcionado.

Al **Laboratorio Nacional de investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal** (LANISAF) por permitirme trabajar al interior de sus instalaciones y por permitirme hacer uso del equipo que fuera parte medular de la presente investigación

Al el **Dr. Clemente Villanueva Verduzco** por la excelente dirección del presente proyecto de investigación y por la amistad brindada, así como sabios consejos

Al **Dr. José Enrique Herbert Pucheta** por su inigualable apoyo dentro y fuera del laboratorio, estar siempre con la mejor disposición para aclarar dudas y dar siempre recomendaciones atinadas.

Al **Dr. Mateo Vargas Hernández** por su inmensa sabiduría y por ser un gran investigador ejemplar.

Al **Dr. Marcelo Acosta Ramos** por los buenos consejos a lo largo de estos dos años y su gran amistad.

A la **Dra. Evert Villanueva Sánchez** por su apoyo incondicional en todos los ensayos realizados dentro del laboratorio, por su amabilidad y grata amistad.

DATOS BIOGRÁFICOS

EDUCACIÓN

CÉDULA PROFESIONAL: 11185375

Técnico Agropecuario

- Preparatoria: Centro de Estudios Técnicos (CET).
- Periodo: 2010-2012

Ingeniero Agrónomo Fitotecnista

- Centro de Estudios Profesionales (CEP-CSAEGRO). Aprobado por unanimidad y con Carta de Felicitación (Acta No. 1393) (Mejor promedio de la generación).
- Periodo: 2012-2016.
- Servicio social: Producción de plantas ornamentales en macetería como Noche buena, anturio, cuna de moisés, singonio, etc. (CDT-FIRA Tezoyuca, Mor).
- Desempeño: Acreedor al PREMIO CENEVAL AL DESEMPEÑO DE EXCELENCIA-EGEL (mayo de 2017)

ORIGEN

CURP: AUCG940701HGRBSR06

- Fecha de nacimiento: 01 de julio de 1994.
- Lugar de nacimiento: Huitzuco de los Figueroa, Guerrero.
- Residencia: Quetzalapa, Gro, municipio de Huitzuco de los Figueroa.

RESUMEN GENERAL

“CARACTERIZACIÓN METABOLÓMICA DE GENOTIPOS DE CALABAZA RESISTENTES A DAMPING OFF”

“METABOLOMICS FINGERPRINT OF PUMPKIN GENOTYPES RESISTANT TO DAMPING OFF”

Gerardo **Abundez**¹, Clemente **Villanueva-Verduzco**², José Enrique **Herbert-Pucheta**³

México es líder en producción de Cucurbitáceas y su importancia agroalimentaria se basa en su alto contenido proteico y equilibrada proporción de ácidos grasos. Sin embargo, este cultivo es susceptible a ser atacado por el complejo Damping off. Este último, al ser un conglomerado de hongos habitantes de todos los suelos agrícolas, afecta con facilidad a la totalidad de zonas productoras de calabazas. Con pérdidas de hasta un 90% de producción total, el complejo *Fusarium-Rhizoctonia-Pythium-Phytophthora* es un riesgo presente durante todo el ciclo de cultivo. El mejoramiento fitogenético es una estrategia alternativa para su combate, sin necesidad del uso de transgénicos o pesticidas. La caracterización de genotipos resistentes a Damping off se puede dar a diferentes escalas *omics* (genómica-transcriptómica-proteómica-metabolómica) y es indispensable para la optimización de recursos en programas de mejoramiento genético a escala nacional e internacional. El presente trabajo comprende el primer estudio a nivel metabolómico de caracterización de cuatro diferentes especies del género *Cucurbita* (*C. pepo*, *C. argyrosperma*, *C. moschata* y *C. ficifolia*) resistentes a Damping off. Se obtuvieron perfiles metabolómicos por Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno a alta resolución y espectroscopía de Infra-Rojo Cercano como “huellas dactilares” que permiten diferenciar especies y sus respectivas mejoras genéticas.

Palabras clave: Metabolómica de calabazas, Damping off, Resonancia Magnética Nuclear, Infra-Rojo Cercano

2. Director de tesis
3. Asesor

ABTRACT

Mexico is world-wide leader in Cucurbits production, whereas its agro-alimentary importance is based in its high protein content and in its equilibrated fatty acid content. Nevertheless, said crop is susceptible to be damaged by the Damping off complex. The latter, being in turn a fungi conglomerate, found in roughly every agricultural soil, easily affects a broad range of pumpkin producing areas. With losses up to 90% of total production, the complex *Fusarium*-*Rhizoctonia*-*Pythium*-*Phytophthora* is a present risk during the whole agricultural cycle. The phylogenetic improvement comprises an alternative strategy against Damping off complex with no use of transgenic or pesticides. The genotype characterization resistant to Damping off may be done at any omics range (genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics) and it is indispensable for optimizing genetic improvement programs at national and international scale. The present work comprises the first study at metabolomics level for characterizing four different species from Cucurbits gender (*C. pepo*, *C. argyrosperma*, *C. moschata* and *C. ficifolia*) resistant to Damping off. Metabolomics profiles were obtained with the use of high-resolution Proton Nuclear Magnetic Resonance and Near Infrared spectroscopies as “fingerprints” that allow distinctions between species and their respective genetic improvements.

Keywords: Pumpkin metabolomics, Damping off, Nuclear Magnetic Resonance, Near Infrared.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La familia Cucurbitaceae incluye 118 géneros y 825 especies, México es uno de los más importantes centros de diversidad. Las cucurbitáceas han tenido un importante papel cultural y económico entre los diferentes estratos sociales. Varias especies se encuentran entre las primeras plantas domesticadas por los seres humanos y hoy forman parte de los alimentos básicos a nivel mundial. La calabaza (*Cucurbita* spp.) presenta órganos comestibles y tiene una relación fuerte con la alimentación humana; en México se consumen diferentes partes de la planta como flores, punta de las guías, semillas y frutos tiernos y maduro. La pulpa es rica en carbohidratos, provitamina A y fibra soluble; las semillas en proteína (32-40%) y aceite vegetal (40%). El tamaño de la semilla de esta especie indica que se seleccionó para los propósitos anteriores (Sánchez-de la Vega et al., 2018).

Las enfermedades que afectan a este cultivo constituyen una limitante para su producción, sobre todo cuando no se utilizan cultivares con resistencia. De los diversos microorganismos fitopatógenos que atacan a las plantas, como pueden ser: virus, hongos, bacterias, nemátodos, fitoplasmas, y viroides; son los hongos el grupo que más enfermedades ocasiona y por lo tanto sobre el que más investigación se ha realizado. Se sabe que más de 8,000 especies de hongos pueden causar enfermedades en las plantas. Damping off es el término que comúnmente se le da el daño por un complejo de hongos habitantes del suelo y que generalmente ataca el estado de plántulas o semilleros en una amplia gama especies vegetales. Los hongos *Phytophthora*, *Fusarium*, *Pythium* y *Rhizoctonia* integran a este complejo, el cual genera importantes pérdidas a nivel mundial debido a que afectan al cultivo desde etapas tempranas y dichos agentes están presentes en la mayoría de los suelos agrícolas (Laemmlen, 2017; Sánchez-de la Vega et al., 2018).

México es considerado por diferentes autores entre los países con la mayor riqueza florística a nivel mundial, lo cual crea un fuerte compromiso para conocer, conservar y utilizar sustentablemente dichos recursos. A nivel nacional las especies cultivadas del género *Cucurbita* (*C. pepo* L., *C. argyrosperma* Huber, *C. ficifolia* Bouché y *C. moschata* Duch.) tienen una amplia distribución a nivel nacional e internacional, así como una amplia diversidad genética (Lira et al., 1998; Sánchez-de la Vega et al., 2018).

Recientemente, algunos avances en el campo de la física y la química analítica, sobre todo a nivel de Espectroscopía de Masas a través de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y de Infra-Rojo cercano (IRC), además del tratamiento informático de los datos, han permitido generar información sobre el estado energético, oxidativo, reproductivo, anabólico y catabólico de un organismo y sus cambios. Este tipo de tecnologías permiten generar perfiles metabolómicos de muestras específicas con niveles de sensibilidad intermedios gracias a la Espectroscopía por IRC, además de tener la virtud de ser altamente reproducibles por efecto de la RMN. Además, el desarrollo de un protocolo eficiente que utilice los beneficios de estas técnicas es imprescindible ya que la inversión monetaria y de tiempo es mucho menor en comparación con otras técnicas como la espectrometría de masas.

1.1 Objetivos

Contrastar perfiles metabolómicos de diferentes especies de calabaza con resistencia a Damping off por medio de una prueba piloto utilizando la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la espectroscopía de Infra-Rojo Cercano (IRC).

1.1 Objetivos específicos

- Comparar los perfiles metabolómicos de 4 especies de calabaza (*C. pepo*, *C. argyrosperma*, *C. ficifolia* y *C. moschata*) a partir de 18 líneas mejoradas con el fin de identificar sus diferencias y asociarlas a cada género.
- Relacionar las diferencias en los perfiles metabolómicos de 18 líneas de calabaza a la resistencia o susceptibilidad a Damping off.

1.2 Hipótesis

Es posible identificar diferencias en los perfiles metabolómicos de genotipos de calabaza que permitan: i) identificar a cada una de las 4 especies en estudio; ii) asociar la resistencia o susceptibilidad a Damping off todo esto a partir de una prueba piloto para la obtención de perfiles metabolómicos utilizando la RMN y la espectroscopía de IRC.

CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El cultivo de Calabaza (*Cucurbita* spp.)

El género *Cucurbita* comprende 25 especies silvestres y 5 cultivadas, además es nativo de la de la región de Mesoamérica y México es considerado su centro de origen y diversificación de las 25 especies silvestres, 12 poseen un ciclo vegetativo anual y están distribuidas en zonas de clima tropical, en tanto que las 8 restantes poseen ciclo vegetativo perenne y se encuentran dispersas en áreas de clima frío y desértico (Figura 1). Las cinco especies domesticadas son: *C. pepo*, *C. moschata*, *C. ficifolia*, *C. maxima* y *C. argyrosperma*. Los cucurbitáceas fueron algunas de las primeras plantas domesticadas en América, hace ya más de 10.000 años. Dentro del género *Cucurbita*, cada evento de domesticación ocurrió de manera independiente, a veces en más de una ocasión. Hoy en día, las cucurbitáceas domesticadas todavía tienen un papel fundamental en la dieta de las personas en México, América Central y América del Sur y en muchas otras regiones del mundo y se consideran un recurso fitogenético esencial (Cerón et. al., 2012; Sánchez-de la Vega et al., 2018).



Figura 1. Diferentes frutos de calabaza (*Cucurbita* spp.).
Fuente: Robert, 2010

2.1.1 Importancia

A nivel mundial, México ocupa el sexto lugar en lo que a producción de calabaza se refiere, solo antecedido por China, India, Rusia, Ucrania y Estados Unidos. En el año 2016 y según datos de la FAO a nivel nacional se cosechó una superficie de 36,721 ha de calabaza (calabazas, zapallo y calabaza confitería, FAO) (Figura 2), dicha superficie aportó una producción para ese año de 667,048 ton. Cabe recalcar algo que ocurrió en el año 2017 en comparación con el año anterior, pues la superficie cosechada para 2017 disminuyó apenas un 0.3%, mientras que la producción para el mismo año tuvo un incremento de casi 5%.

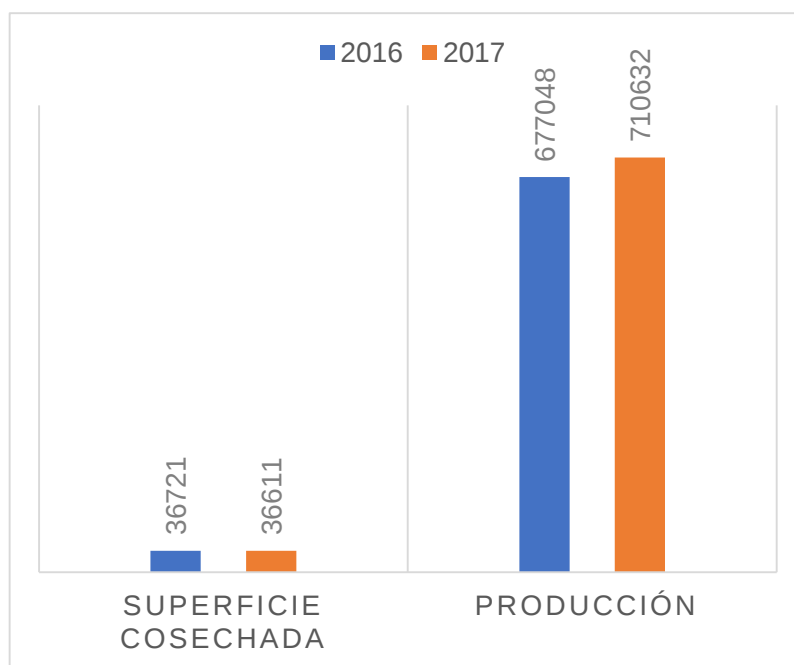


Figura 2. Comparación de la superficie cosechada y producción de calabaza en los últimos dos años según datos de la FAO (2019).

2.1.2 Diferencias morfológicas entre especies cultivadas

Las cinco especies cultivadas del género *Cucurbita* tienen una amplia gama de caracteres morfológicos que las diferencia entre sí (Cuadro 1). Particularmente en México la variación genética es muy amplia, principalmente en cuanto a forma, tamaño y coloración del fruto, cantidad de semilla producida, calidad y cantidad de pulpa, tolerancia a enfermedades y precocidad (Figura 3) (Villanueva, 2007). En el Cuadro 1 se enlistan los caracteres morfológicos que diferencian a cada una de las especies cultivadas.

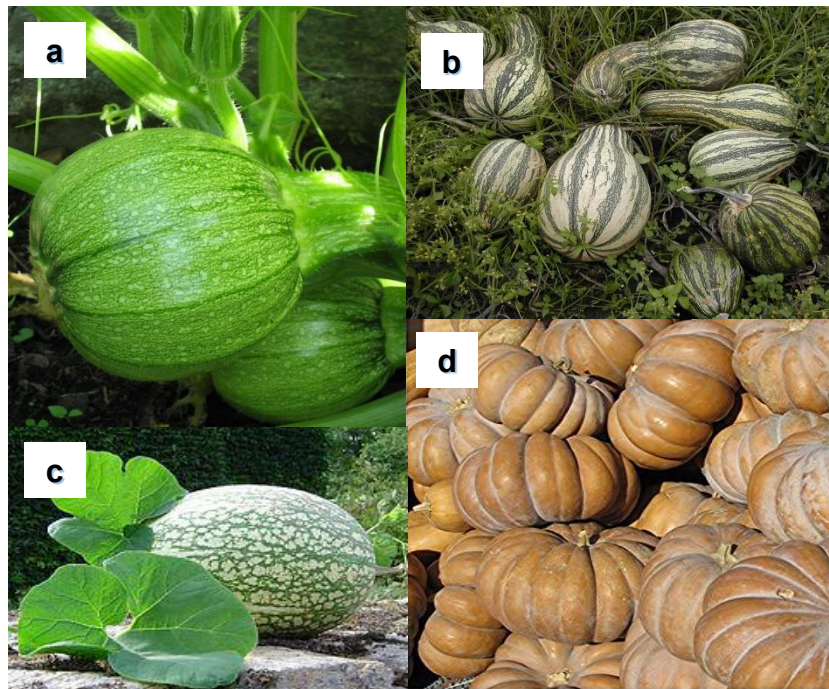


Figura 3. Cuatro de las cinco especies cultivadas del género *Cucurbita*. a) *Cucurbita pepo*; b) *Cucurbita argyrosperma*; c) *Cucurbita ficifolia* y; d) *Cucurbita moschata*.

Cuadro 1. Caracteres distintivos de las cinco especies cultivadas de Cucurbita

Especie	Caracteres distintivos
	Tallo
<i>C. pepo</i>	Duro de 5 ángulos. Sin sarcillos en variedades arbustivas
<i>C. maxima</i>	Suave, redondo
<i>C. argyeosperma</i>	Duro de 5 ángulos
<i>C. moschata</i>	Moderadamente duro, de 5 ángulos ligeros
<i>C. ficifolia</i>	Duro, ligeramente angulado
	Hojas
<i>C. pepo</i>	Profundamente lobuladas, espiculadas
<i>C. maxima</i>	Lóbulos ligeros, moderadamente espiculada
<i>C. argyeosperma</i>	Lóbulos moderados, no espiculados
<i>C. moschata</i>	Lóbulos poco profundos
<i>C. ficifolia</i>	Lobulación moderada, moderadamente espiculada
	Androceo
<i>C. pepo</i>	Corto, grueso, cónico
<i>C. maxima</i>	Corto, grueso, columnar
<i>C. argyeosperma</i>	Largo, delgado, columnar
<i>C. moschata</i>	Largo, delgado, columnar
<i>C. ficifolia</i>	Corto, grueso, columnar
	Pedúnculo del fruto
<i>C. pepo</i>	Duro, angular, costillado, ligeramente acampanado hacia el punto de inserción con el fruto
<i>C. maxima</i>	Suave, redondeado, engrosado por corteza suave. (Flores perfumadas)
<i>C. argyeosperma</i>	Suave a duro, no angular, notablemente engrosado por corteza suave a dura
<i>C. moschata</i>	Duro, angular, costillado, ligeramente acampanado hacia el punto de inserción con el fruto
<i>C. ficifolia</i>	Duro, suavemente angulado, ligeramente acampanado
	Pulpa del fruto
<i>C. pepo</i>	De grano grueso
<i>C. maxima</i>	De grano fino
<i>C. argyeosperma</i>	De grano grueso
<i>C. moschata</i>	De grano, fibras gelatinosas
<i>C. ficifolia</i>	De fibra gruesa y fuerte, color blanco
	Inserción (punta) de la semilla
<i>C. pepo</i>	Obtusa, simétrica
<i>C. maxima</i>	Aguda, asimétrica
<i>C. argyeosperma</i>	Obtusa, ligeramente asimétrica
<i>C. moschata</i>	Obtusa, ligeramente asimétrica
<i>C. ficifolia</i>	Obtusa, ligeramente asimétrica
	Margen (borde) de la semilla
<i>C. pepo</i>	Suave, obtuso
<i>C. maxima</i>	Suave, obtuso
<i>C. argyeosperma</i>	Corchoso de color gris o azul
<i>C. moschata</i>	Suave, obtuso y a veces fibroso
<i>C. ficifolia</i>	Suave, obtuso. Semillas generalmente negras

Fuente: Villanueva, 2003.

2.2 Damping Off

El marchitamiento fúngico (Damping-off) es una enfermedad que sufren muchas especies vegetales en el estadio de plántulas, causado por diferentes agentes fúngicos que producen la destrucción de vasos de xilema próximos al sitio de infección, causando de esta forma un “estrangulamiento” en el



Figura 4. Daño por Damping off en diferentes Cucurbitáceas.

tallo que conduce al marchitamiento y la muerte de plántulas, síntomas que son fácilmente observables a simple vista (Figura 4), daños que disminuyen hasta un 90% la producción de esta hortaliza. Los agentes causales de ésta enfermedad pueden ser varias especies de hongos, como por ejemplo *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y otros microorganismos filamentosos con apariencia fúngica, que en la actualidad se encuentran clasificados dentro del Reino Stramenipila y pertenecientes al Phylum Oomycota como son los géneros *Pythium* sp. y *Phytophthora* sp. (Robledo, 2016). Los hongos que causan estas enfermedades pueden atacar a la semilla o la plántula antes de que ésta emerja por encima de la superficie del suelo, causando una putrefacción de la semilla o la pudrición pre-emergente. Cuando esto sucede, el resultado es una mala emergencia que pueden ser erróneamente atribuido a la mala calidad de las semillas o a la presencia de plagas (Laemmle, 2017).

2.2.1 Control de Damping off

El control de Damping off es difícil. Esta enfermedad debe preverse y evitarse mediante tratamientos a la semilla o plántulas, antes de que estas se lleven al campo. Los tratamientos en surcos de siembra y los tratamientos en bandas sobre la línea de la planta después del trasplante también pueden ser útiles. La siembra o trasplante superficial promueve una rápida germinación y desarrollo vegetal, lo que disminuye el tiempo de exposición a los agentes causales. Los fungicidas más utilizados para el control del *Pythium*, ya sea como tratamientos de semillas o plántulas, incluyen ingredientes activos como metalaxil, thiram, algunos compuestos con cobre y captan. *Rhizoctonia solani*. El ataque por *R. solani* puede ser suprimido con pentaclorobenceno (PCNB), clorotalonil, benomil, tiofanato metílico, carboxin, mancozeb e iprodiona (Laemmle, 2017; Pereira et al., 2014).

2.3 Metabolómica

Desde principios de la década de los noventa, ha emergido con fuerza la metabolómica y otras ciencias ómicas, como la transcriptómica y la proteómica. El término metabolómica comparado con el de genómica y proteómica surgió posteriormente. Esta ciencia cataloga y cuantifica a las moléculas pequeñas, productos del metabolismo primario o especializado, que se encuentran en los sistemas biológicos, es decir, proporciona una visión general de los fitoquímicos en una célula, tejido, órgano, y/o de toda la planta. Dando lugar a avances importantes sobre cómo cambian los perfiles metabólicos dentro de una población, de un organismo o de un tejido como respuesta a alguna situación, tal como enfermedades, temperatura, estrés hídrico, etcétera (Bázar et al., 2016; Trethewey, 2004)

Metabolómica es el término técnico que denomina el estudio integral de moléculas pequeñas ($<1,500$ Da) dentro de un sistema biológico, bajo un conjunto específico de condiciones ambientales (Wishart, 2007, 2008). Debido a la gran variedad de propiedades químicas y físicas, así como a la amplia gama de concentraciones, en las que pueden estar presentes los metabolitos, se han utilizado diferentes plataformas analíticas para estudiar el metaboloma, que se estima en hasta 25,000 compuestos diferentes en una sola planta (Fiehn, 2002). Especialmente las plataformas de RMN y EIRC se emplean para los enfoques metabólicos. Sin embargo, no existe una técnica única que pueda cubrir todo el metaboloma. Para debilitar este hecho, es muy importante optimizar los parámetros de medición y el proceso de extracción para detectar la mayor cantidad posible de metabolitos con altas intensidades de señal y buena reproducibilidad. Particularmente con respecto a los estudios de metabolómica no dirigida para la obtención de perfiles metabólicos, es decir con el objetivo de comparar patrones de metabolitos sin tener un conocimiento a priori sobre los analitos (Trethewey, 2004).

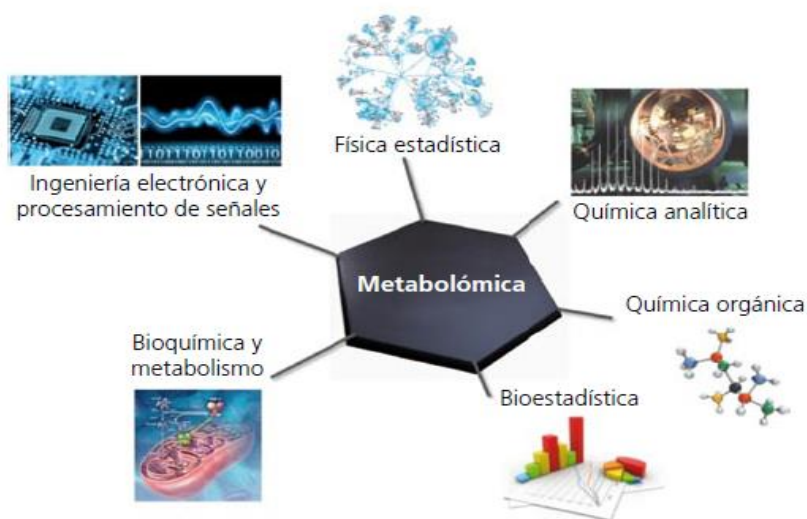


Figura 5. La metabolómica y sus bases

En este sentido, la composición metabólica de una planta entera o de un tejido concreto está directamente vinculada a cambios en la expresión génica (cambios en la composición de mRNA) y la síntesis de proteínas. Por tanto, queda claro que los metabolitos son en muchos casos el producto final de la expresión génica y constituyen el verdadero fenotipo de un individuo (Foston, 2014; Wishart, 2008)

2.4 El metaboloma de las plantas

La planta o los productos derivados de ella son omnipresentes en una amplia gama de dominios de aplicación. Un mejor conocimiento de la composición y el metabolismo de las plantas puede afectar diversos dominios, desde la forma en que las cultivamos, el fitomejoramiento, la nutrición humana o animal, la farmacéutica y las biotecnologías verdes, solo por decir algunos. Los metabolitos de las plantas son diversos en cuanto a la estructura o las familias de compuestos, así como a concentraciones (Figura 6) (Ferne & Pichersky, 2015). Hace quince años, se ha estimado que su número total es de aproximadamente 200,000 en todo el reino vegetal; con concentraciones que van desde nM para hormonas vegetales hasta varios cientos de mM para los principales azúcares solubles (Nakabayashi & Saito, 2013). El término "metaboloma" se suele restringir a los metabolitos con un bajo peso molecular y los metabolitos de las plantas analizados por la metabolómica se clasifican en metabolitos primarios o metabolitos especializados (antes llamados metabolitos secundarios). Los metabolitos primarios de las plantas son compuestos orgánicos comunes en todas o la mayoría de las especies de plantas y son esenciales para el crecimiento, desarrollo y reproducción de las mismas. Son productos intermedios y productos del metabolismo central implicados en la fotosíntesis y otros procesos biosintéticos (Cozzolino et al., 2004; Kim & Buell, 2015).



Figura 6. El metabolismo de las plantas y sus funciones ecológicas adaptado de Deborde et al., 2017.

2.4.1 Metabolitos primarios y especializados

Los metabolitos primarios pertenecen a diferentes familias de compuestos, principalmente carbohidratos, ácidos orgánicos, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, esteroides o lípidos (Figura 1). En 2011, el número de metabolitos primarios de las plantas se estimó en 10.000 compuestos. Algunos de ellos también están presentes en animales y microorganismos, mientras que otros son específicos del reino vegetal. En sincronía con las necesidades de la comunidad de metabolómica, se han desarrollado varias bases de datos de metabolómica con datos espectrales de RMN experimentales de los compuestos de referencia (Krishnan et. al., 2005).

Los metabolitos especializados también son compuestos orgánicos de bajo peso molecular y se definieron inicialmente como no esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que están involucrados principalmente en la interacción entre la planta y el medio ambiente (respuesta al estrés biótico o abiótico y los mecanismos de defensa), así como para estrategia reproductiva de las plantas (Mounet et al., 2009; Vasilev et al., 2016). Desde la década de 1980, esta definición ha evolucionado pues hoy en día se sabe que algunos de ellos están implicados en la estrategia de reproducción de la planta, la protección contra los rayos ultra violeta, relacionados a especies reactivas de oxígeno (ERO), algunos metabolitos son específicos y se encuentran solo en ciertas especies, por lo que se denominan especializados. Los metabolitos especializados pertenecen a diferentes familias de compuestos (fenólicos, alcaloides (por ejemplo, nicotina), terpenoides, policétidos, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, cumarinas, taninos, benzoxazinoides) y se derivan del metabolismo primario. La familia principal son los fenólicos que están involucrados en, por ejemplo, Respuestas inmunitarias de las plantas frente a microbios patógenos o microbios simbióticos para el proceso de nodulación, protección contra la luz UV-B, protección ROS o estrategias reproductivas de las plantas, con síntesis de colorantes atrayentes de antocianinas para polinizadores y dispersión de semillas por animales (Mounet et al., 2009)

2.5 La espectroscopía de Infra-Rojo Cercano (IRC) como método analítico

Las señales de IRC están directamente relacionadas a las vibraciones moleculares y a las combinaciones de estas vibraciones. Su rango espectral se encuentra localizado entre los 780 y 2526 nm ($12821\text{-}3959\text{ cm}^{-1}$), según la definición de la Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (Kim et. al., 2010).

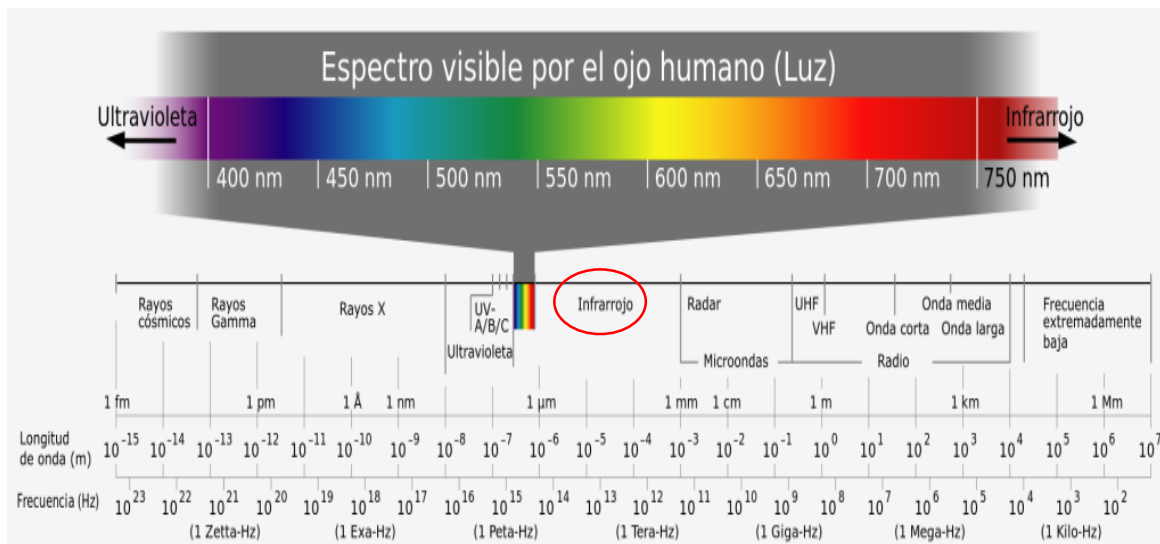


Figura 7 Localización del espectro de Infra-Rojo Cercano.

El principio de este tipo de pruebas se basa en el fenómeno de que cuando una muestra analizada es irradiada por IRC, la radiación es reflejada o absorbida por enlaces moleculares que consisten en la muestra y/o se transmiten, lo que resulta en cambios de energía (Golic, 2003). A su vez, los cambios de energía en la luz irradiada pueden reflejar algunos enlaces químicos destacados y, por lo tanto, las características de la muestra analizada. Las ondas armónicas, así como las combinaciones de vibración en los enlaces: C-H, O-H, N-H y C = O, así como algunos otros enlaces, pueden observarse en el rango IRC, lo que hace posible la medición de varios parámetros en el análisis de muestras orgánicas. De esta manera la espectroscopía por IRC asigna características específicas a componentes químicos específico aún dentro de mezclas complejas como extractos orgánicos con una alta sensibilidad, además, extrae información contenida en los espectros fácilmente pues es una prueba de bajo costo y rápida. Sin embargo, los espectros IRC suelen ser complejos debido a que las bandas de absorción muchas veces se superponen, lo que dificulta la interpretación visual de los espectros (Sumner et. al., 2015).

2.6 La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) como una técnica de análisis isotópica

Desde la primera detección de señales de resonancia magnética nuclear (RMN) por los grupos de Bloch y Purcell, la espectroscopia de RMN ha evolucionado enormemente a través del desarrollo de instrumentos y métodos que llevan a su aplicación en todos los campos. La base física de la RMN se basa en el hecho de que ciertos núcleos atómicos poseen un momento magnético angular y, por lo tanto, cuando se aplica un campo magnético externo, existen dos estados de espín. La RMN alinea los momentos magnéticos con un campo magnético constante aplicado y altera esta alineación utilizando un campo magnético de radiofrecuencia (RF) ortogonal alterna (Son et al., 2008; Ward et al., 2010).

Esta perturbación induce un fenómeno resonante que se utiliza en las mediciones de RMN. La señal obtenida se puede medir de muchas maneras y luego procesarse para generar un espectro de RMN para uso de análisis. Entre los núcleos relevantes empleados en la RMN, ^1H , ^{13}C y ^{31}P (Miyake et. al., 1997). Para la misma muestra, un investigador puede seleccionar diferentes núcleos para detectar diferentes características, o para mejorar el espectro. Por ejemplo, la grasa de la leche se puede analizar a partir de los espectros ^1H o ^{13}C , este último ofrece una mejor resolución en la señal, que se traduce en un ruido menor. Los espectros de RMN comúnmente utilizados son los espectros ^1H -RMN unidimensionales, que no solo pueden proporcionar evaluaciones cualitativas de la muestra sino también determinaciones cuantitativas, ya que el área bajo la resonancia se puede hacer proporcional a la concentración (Oliveira et. al., 2019).

2.6.1 Bases para el análisis de espectros RMN

El estudio de un espectro de resonancia magnética nuclear permite la obtención de apreciable información sobre la estructura de un compuesto orgánico a la que es conveniente acceder de una forma sistematizada para conseguir un más alto rendimiento (Figura 8). Cuatro son los aspectos primarios a tomar en cuenta, a saber: a) *El número de señales*, que se corresponden con el número de tipos de hidrógeno distintos existentes en la molécula, entendiendo por “tipos de hidrógeno” no diferencias en cuanto a la naturaleza del elemento que, lógicamente, en todos es igual sino los distintos alrededores moleculares, electrónicos y estéricos, que puede percibir un hidrógeno por su situación concreta en una molécula; b) *La posición de las señales*, en referencia al valor de abscisa con que cada señal aparece en el espectro y que es función del campo magnético necesario para hacer resonar cada tipo de hidrógeno influenciado por alrededores electrónicos moleculares distintos; c) *La multiplicidad de las señales*, las señales que representan a los distintos tipos de hidrógeno son señales simples, singletes, es decir señales compuestas de un único pico,

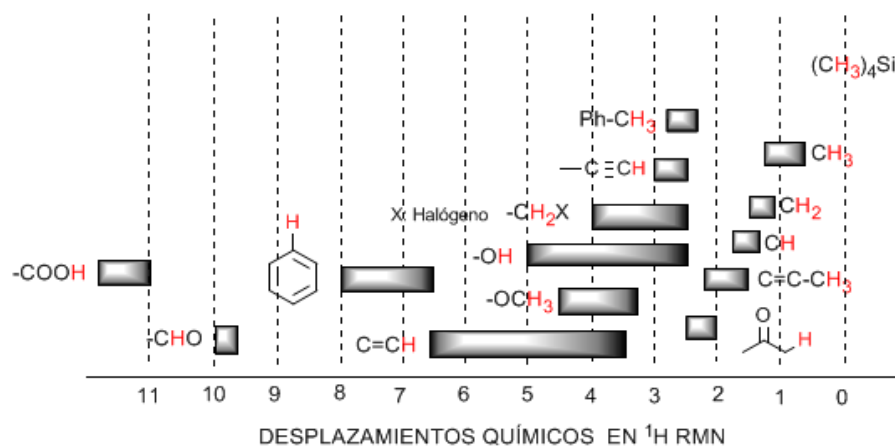


Figura 8 Ejemplos de desplazamientos químico y su interpretación.

sin embargo, es muy frecuente encontrar en los espectros señales múltiples conteniendo varios picos, con una proporción definida, representando el conjunto a un sólo tipo de hidrógeno. La causa de esta multiplicidad es el efecto magnético que ejercen los núcleos de hidrógeno contiguos sobre el hidrógeno en resonancia, lo que se conoce como “acoplamiento spin-spin”, y; d) *área bajo las señales*. La absorción de energía que se produce al entrar en resonancia un tipo de hidrógeno es directamente proporcional al número de hidrógenos que integran ese tipo, porque a más hidrógenos se requiere absorber más energía y se aprecia una mayor intensidad en la señal generada. La mejor forma de medir esta magnitud proporcional a la absorción es medir el área bajo las señales. Esta área no se expresa en unidades absolutas de superficie sino con una línea de saltos los cuales son en su altura proporcionales a la superficie contenida bajo las curvas por lo que la medida tiene carácter relativo, no absoluto, a no ser que sea conocido el número total de hidrógenos que posee la molécula en estudio lo que permitirá deducir el salto que corresponde a cada hidrógeno dividiendo el salto total entre el número total de hidrógenos.

2.7 El procesamiento de los datos

Los espectros sin procesar no siempre pueden interpretarse directamente o usarse para crear modelos robustos, ya que tiene defectos como la variación de la pendiente, la dispersión de la luz, el ruido y el desplazamiento de la línea de base, causados por el tamaño de las partículas o las propiedades físicas de los elementos. Los datos espectrales sin procesar se someten a una transformación matemática para minimizar la fuente de variabilidad espectral no asociada con el propósito de investigación (clasificación o predicción).

Es importante aclarar que los algoritmos de preprocesamiento no pueden crear información analítica, pero pueden rescatarse eliminando las fuentes de variabilidad espectral. Sin embargo, una aplicación excesiva o incorrecta de los algoritmos de preprocesamiento puede causar la pérdida de información útil (Oliveira et al., 2019).

Para reducir la variabilidad espectral causada por los efectos de dispersión, se utilizan las técnicas de corrección de dispersión multiplicativa y de variación normal estándar. Estos algoritmos de preprocesamiento podrían usarse individualmente y en combinación. Sin embargo, las combinaciones de algoritmos que fueron diseñados para superar la misma fuente de variabilidad espectral no deben utilizarse (Oliveira et al., 2019; Trethewey, 2004).

2.8 Análisis exploratorios o no dirigidos

Los métodos exploratorios incluyen algoritmos que utilizan información espectral para descubrir la relación entre muestras y sus respectivas variables. Estos algoritmos permiten identificar la existencia de grupos naturales o tendencias entre las muestras, lo que debe ser consistente con la información previa de cada muestra. De hecho, los métodos no dirigidos son la etapa previa a los métodos de predicción o clasificación, lo que permite identificar valores atípicos (muestras atípicas) y variables que contienen información importante para la discriminación de grupos de muestra (Krishnan et al., 2005; Oliveira et al., 2019; Trethewey, 2004).

2.8 Análisis multivariado clasificatorio

Los métodos de clasificación permiten asignar especies, clases o categorías que se definen previamente (es decir, adulterado /no adulterado, origen geográfico X /origen geográfico Y, etc.). Usando técnicas espectroscópicas, cada categoría se crea utilizando la información conjunta de un grupo de muestras con propiedades espectrales comunes, características que las diferencian de cualquier otro conjunto de muestras. Luego, con las categorías creadas, se establecen reglas de clasificación para evaluar una muestra desconocida y clasificarla como parte de una de las categorías definidas (o no). Los métodos populares de discriminación tienen como objetivo establecer una regresión lineal entre una matriz de variables independientes X (espectros) y una matriz de variables dependientes (clases). Luego, las muestras se asignan a las clases de acuerdo con las predicciones del modelo y los valores de umbral de clase definidos sobre el mismo. La evolución en el diseño de dispositivos espectroscópicos permite que los datos se recopilen fácil y rápidamente. Individualmente, se pueden desarrollar modelos predictivos y de discriminación para detectar las diferencias entre diferentes muestras, aunque a veces no es suficiente. Con este fin, se están desarrollando nuevos enfoques para el análisis de datos. La fusión de datos se muestra como una técnica atractiva y casi siempre más eficiente que el uso de técnicas individualmente. La fusión de datos permite explotar la sinergia de la información individual para obtener un modelo optimizado. La fusión de datos se puede implementar siguiendo tres estrategias: nivel bajo, medio y alto. En la fusión de datos de bajo nivel, los datos sin procesar obtenidos de cada técnica se fusionan en una sola matriz, ya que los datos tienen cantidades físicas similares, para luego proceder con los análisis multivariados (Oliveira et al., 2019; Yadav & Murthy, 2016).

En la fusión de datos de nivel medio, las variables más importantes (sin procesar) se extraen de cada técnica individual y luego se fusionan en una sola matriz, para luego analizarlas juntas. Finalmente, la fusión de datos de alto nivel es una estrategia que, a diferencia de otras estrategias, fusiona los modelos obtenidos del procesamiento de los datos individuales de cada técnica. En resumen, los enfoques de fusión de datos de nivel medio y bajo presentan una fusión de variables (todas o las más importantes) para crear un modelo; por lo tanto, el tiempo de cálculo es mayor. En contraste, la fusión de datos de alto nivel reduce el tiempo de cálculo al fusionar los modelos obtenidos de cada fuente de datos. Por lo tanto, es probablemente la técnica más utilizada para el análisis de muestras orgánicas. Con base a lo anterior, hoy en día se sabe que los estudios y pruebas espectroscópicas pueden identificar de manera eficiente adulterantes externos, el origen geográfico, diferenciar especies, entre otras (Oliveira et al., 2019; Trethewey, 2004).

2.9 Perfilado metabólico para explorar el metabolismo primario y secundario de las plantas

En el campo del metabolismo de las plantas, la integración de los datos de un perfil metabólico junto con los datos transcriptómicos arrojan a la luz información que permite comprender mejor los fenómenos del metabolismo primario y especializado de las plantas. En este sentido Mounet et al. (2009) detectaron treinta y siete correlaciones directas entre genes y metabolitos que involucran genes reguladores (p. Ej., Las correlaciones entre glutamina y 2 factores de transcripción, es decir, un bZIP y un MYB) en tejidos de frutos de tomate en expansión (mesocarpio y tejidos locales cosechados a 12, 20 y 35 días después de la antesis durante la fase de expansión celular) mediante comparaciones por pares de contenidos de metabolitos y perfiles de expresión génica.

Por otro lado Bourgis y colaboradores (2011), por medio de un análisis transcriptómico y el metaboloma comparativo de diferentes especies de palma aceitera (hasta un 90% de aceite en el mesocarpio) y datilera (palma que acumula hasta 53% de azúcares) , lograron comprender mejor los mecanismos que conducen a una diferencia tan extrema en la partición del carbono, se compararon el contenido de transcriptoma y metabolito de la palma aceitera y la palma datilera durante el desarrollo del mesocarpio. Comparado con la palma datilera, el alto contenido de aceite en la palma aceitera se asoció con niveles de transcripción mucho más altos para todas las enzimas de síntesis de ácidos grasos, transportadores de plastidios específicos y enzimas clave del metabolismo plastidial del carbono, incluida la fosfofructoquinasa, piruvato quinasa y piruvato deshidrogenasa.

Otro estudio interesante fue realizado por Le Gall et al. (2017) sobre la estrategia de aclimatación al frío de dos genotipos de *Miscanthus* con distintas sensibilidades a las heladas en la etapa juvenil. Uno es particularmente sensible a las heladas, *Miscanthus giganteus*, mientras que el otro, *Miscanthus sinensis* August Feder es tolerante. *Miscanthus*, una planta perenne de C4 con alto rendimiento de biomasa y bajo requerimiento de insumos, es un cultivo energético no alimentario. Para cada genotipo, las partes aéreas se recolectaron en varios puntos de tiempo (0, 4 y 8 días) después de la aclimatación al frío (12 °C día / 12 °C noche). Se identificaron cuarenta y dos metabolitos en los espectros arrojados por NMR de extractos hidrometanólicos de partes aéreas de *Miscanthus*. Cuarenta eran comunes a los dos genotipos, pero sus diferencias radicaban en concentraciones relativas. La betaína y el hidroxibenceno solo se detectaron en las especies sensibles a las heladas. Durante la aclimatación al frío, en ambos genotipos, las concentraciones relativas de tres metabolitos (glucosa, fructosa y ácido shikímico) disminuyeron y aumentaron ocho (rafinosa, estaquiosa, alanina, ácido glutámico y tirosina, colina, uridina y adenina).

En ambos genotipos, la rafinosa, un trisacárido y la estaquiosa, un tetrasacárido, ambos conocidos como crioprotectores, estaban presentes en condiciones de control y aumentaron con la aclimatación al frío. Para *M. sinensis*, el genotipo tolerante a las heladas, solo las concentraciones relativas de cuatro metabolitos (maltosa, fenilalanina, ácido láctico y trigonelina) cambiaron específicamente durante la aclimatación al frío, mientras que para *M. giganteus*, el genotipo sensible, se vieron afectadas las concentraciones de seis metabolitos (treonina, ácido gamma-aminobutírico, ácido succínico, ácido fórmico, ácido quínico y sacarosa). Además, comparado con *M. giganteus*, el genotipo tolerante exhibió concentraciones más altas de osmolito prolina y de dos disacáridos, sacarosa y maltosa, lo que podría explicar su mayor tolerancia al frío.

Candidatus Liberibacter es una protobacteria gramnegativa responsable de la enfermedad del enverdecimiento de los cítricos, también llamada enfermedad de Huanglongbing. Se usaron las huellas dactilares y los perfiles metabólicos de la RMN asociados con el análisis multivariado en zumos de frutas de árboles de cítricos asintomáticos y sintomáticos afectados por Huanglongbing y se revelaron cambios significativos en varios compuestos, (fenilalanina, histidina, sinefrina y limonina, esta última medida por HPLC). El mismo enfoque aplicado a las hojas y raíces de árboles de cítricos asintomáticos y sintomáticos reveló modificaciones en los perfiles metabólicos de las hojas (sacarosa, prolina-betaína y ácido málico) fuertemente correlacionadas con los niveles bacterianos estimados por qPCR. Los perfiles metabólicos de la raíz fueron menos modificados (Chin, Mishchuk, Breksa, & Slupsky, 2014; Dos Santos et. al., 2015).

Literatura citada

- Bázár, G., Romvári, R., Szabó, A., Somogyi, T., & Éles, V. (2016). NIR detection of honey adulteration reveals differences in water spectral pattern, 194, 873–880.
- Bertram, H. C., Malmendal, A., Petersen, B. O., Madsen, J. C., Pedersen, H., Nielsen, N. C., ... Duus, J. (2007). Effect of magnetic field strength on NMR-based metabonomic human urine data. Comparative study of 250, 400, 500, and 800 MHz. *Analytical Chemistry*, 79(18), 7110–7115.
- Bourgis, F., Kilaru, A., Cao, X., Ngando-Ebongue, G.-F., Drira, N., Ohlrogge, J. B., & Arondel, V. (2011). Comparative transcriptome and metabolite analysis of oil palm and date palm mesocarp that differ dramatically in carbon partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(30), 12527–12532.
- Cerón G. L.; Legaria S. J. P.; Villanueva V. C.; Sahágun C. J. (2012). Diversidad genética en cuatro especies mexicanas de calabaza (*Cucurbita* spp.). *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 33 (3): 189 – 196, 2010, 33(3), 136.
- Chin, E. L., Mishchuk, D. O., Breksa, A. P., & Slupsky, C. M. (2014). Metabolite signature of *Candidatus liberibacter* asiaticus infection in two citrus varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6585–6591.
- Cozzolino, D., Kwiatkowski, M. J., Parker, M., Cynkar, W. U., Damberg, R. G., Gishen, M., & Herderich, M. J. (2004). Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 73–80.
- D'Angelo, O. R. (2016). Enfermedad de marchitamiento fúngico en plántulas de lechuga: un modelo didáctico-experimental para la enseñanza de los postulados de Koch. Damping-off Disease in Lettuce Seedlings: A Didactic-Experimental Model for Teaching Koch's Postulates., 13(3), 680–685.
- Deborde C, Fontaine JX, Jacob D, Botana A, Nicaise V, Richard-Forget F, Lecomte S, Decourtil C, Hamade K, Mesnard F. (2017). Plant metabolism as studied by NMR spectroscopy. Vol. 102–103. 61-97.

- Golic M. K. Walsh & P. Lawson. (2003). Short-Wavelength Near-Infrared Spectra of Sucrose, Glucose, and Fructose with Respect to Sugar Concentration and Temperature. *Plant Sciences Group*. 57 (2). 139-145.
- Dos Santos F. D., Carlos, E. F., Gil, M. C. S. D. S., Vieira, L. G. E., & Alcantara, G. B. (2015). NMR-Based Metabolomic Analysis of Huanglongbing-Asymptomatic and -Symptomatic Citrus Trees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(34), 7582–7588.
- Fernie, A. R., & Pichersky, E. (2015). Focus Issue on Metabolism: Metabolites, Metabolites Everywhere. *Plant Physiology*, 169(3), 1421–1423.
- Fiehn O. (2002). Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48(1–2), 155–171.
- Foston, M. (2014). Advances in solid-state NMR of cellulose. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 176–184.
- Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, 5(3), 536–549.
- Kim, J., & Buell, C. R. (2015). A revolution in plant metabolism: Genome-enabled pathway discovery. *Plant Physiology*, 169(November), 1532-1539.
- Krishnan, P., Kruger, N. J., & Ratcliffe, R. G. (2005). Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *Journal of Experimental Botany*, 56(410), 255–265.
- Laemmle, F. (2001). Damping-off diseases. Publ. No. 8041. University of California, Davis.
- Le Gall, H., Fontaine, J. X., Molinié, R., Pelloux, J., Mesnard, F., Gillet, F., & Fliniaux, O. (2017). NMR-based Metabolomics to Study the Cold-acclimation Strategy of Two *Miscanthus* Genotypes. *Phytochemical Analysis*, 28(1), 58–67.
- Lira, R., Rodríguez J., C., Alvarado, J. L., Rodríguez, I., Castrejón, J., & Domínguez Mariani, A. (1998). Diversidad e importancia de la familia Cucurbitaceae en México. *Acta Botánica Mexicana*, 42, 43–47.
- Miyake, Y., Yokomizo, K., & Matsuzaki, N. (1997). Rapid Determination of Iodine Value by ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, (7), 15–19.

- Mounet, F., Moing, A., Garcia, V., Petit, J., Maucourt, M., Deborde, C., ... Lemaire-Chamley, M. (2009). Gene and Metabolite Regulatory Network Analysis of Early Developing Fruit Tissues Highlights New Candidate Genes for the Control of Tomato Fruit Composition and Development. *Plant Physiology*, 149(3), 1505–1528.
- Nakabayashi, R., & Saito, K. (2013). Metabolomics for unknown plant metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(15), 5005–5011.
- Oliveira, M. M., Cruz-Tirado, J. P., & Barbin, D. F. (2019). Nontargeted Analytical Methods as a Powerful Tool for the Authentication of Spices and Herbs: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(3), 670–689.
- Pereira, S. I., Figueiredo, P. I., Barros, A. S., Dias, M. C., Santos, C., Duarte, I. F., & Gil, A. M. (2014). Changes in the metabolome of lettuce leaves due to exposure to mancozeb pesticide. *FOOD CHEMISTRY*, 154, 291–298.
- Robledo D. O. (2016). Enfermedad de marchitamiento fúngico en plántulas de lechuga: un modelo didáctico-experimental para la enseñanza de los postulados de Koch. Damping-off Disease in Lettuce Seedlings: A Didactic-Experimental Model for Teaching Koch's Postulates., 13(3), 680–685.
- Sánchez-de la Vega, G., Castellanos-Morales, G., Gámez, N., Hernández-Rosales, H. S., Vázquez-Lobo, A., Aguirre-Planter, E., ... Eguiarte, L. E. (2018). Genetic Resources in the “Calabaza Pipiana” Squash (*Cucurbita argyrosperma*) in Mexico: Genetic Diversity, Genetic Differentiation and Distribution Models. *Frontiers in Plant Science*, 9(March), 1–18.
- Son, H.-S., Kim, K. M., van den Berg, F., Hwang, G.-S., Park, W.-M., Lee, C.-H., & Hong, Y.-S. (2008). ¹H Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomic Characterization of Wines by Grape Varieties and Production Areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 8007–8016.
- Sumner, L. W., Lei, Z., Nikolau, B. J., & Saito, K. (2015). Modern plant metabolomics: Advanced natural product gene discoveries, improved technologies, and future prospects. *Natural Product Reports*, 32(2), 212–229.

- Trethewey, R. N. (2004). Metabolite profiling as an aid to metabolic engineering in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2), 196–201.
- Vasilev, N., Boccard, J., Lang, G., Grömping, U., Fischer, R., Goepfert, S., ... Schillberg, S. (2016). Structured plant metabolomics for the simultaneous exploration of multiple factors. *Scientific Reports*, 6, 1–15.
- Ward, J. L., Baker, J. M., Miller, S. J., Deborde, C., Maucourt, M., Biais, B., ... Beale, M. H. (2010). An inter-laboratory comparison demonstrates that [^1H]-NMR metabolite fingerprinting is a robust technique for collaborative plant metabolomic data collection. *Metabolomics*, 6(2), 263–273.
- Wishart, D. S. (2007). Current progress in computational metabolomics. *Briefings in Bioinformatics*, 8(5), 279–293.
- Wishart, D. S. (2008). Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science and Technology*, 19(9), 482–493.
- Yadav, P., & Murthy, I. Y. L. N. (2016). Calibration of NMR spectroscopy for accurate estimation of oil content in sunflower, safflower and castor seeds. *Current Science*, 110(1), 73–76.

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del área de estudio

La presente investigación se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios Agroalimentarios y Forestal (LANISAF) ubicado en el edificio Efraím Hernández Xolocotxi, en la Universidad Autónoma Chapingo.

3.2 Material Genético

El material genético utilizado para la presente investigación se describe en el siguiente cuadro (Cuadro 2), cabe mencionar que los genotipos y sus respectivas mejoras son producto de un arduo trabajo de investigación y mejoramiento genético que lleva ya más de 20 años, dichos materiales son pertenecientes al banco de germoplasma del Programa de Mejoramiento Genético en Calabazas de la Universidad Autónoma Chapingo el cual tuvo sus orígenes desde el año 1999 y es liderado hasta la fecha por el Dr Clemente Villanueva Verduzco, la resistencia de los materiales genéticos ha sido probada en varias tesis de licenciatura, maestría y doctorado en los departamentos de Parasitología Agrícola y Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.3 Preparación de las muestras de extracto orgánico con cloroformo

Se pesaron 10 g de semilla por cada genotipo utilizado, de primera instancia la semilla se lavó con agua corriente con el fin de retirar todo tipo de impurezas, polvo u algún otro contaminante, todas las muestras se dejaron escurrir por un lapso aproximado de 5 min. A continuación, la semilla pasó por un proceso de secado en un horno convencional de laboratorio por un lapso de 2 horas a una temperatura constante e 80 °C (Figura 8). Posterior a esto, la semilla se molió hasta llegar a un tamaño de partícula aproximado de 1 mm (Figura 8).

Cuadro 2. Relación de genotipos de calabaza utilizados.

Código de identificación	Especie	Característica	Año
T1	<i>C. pepo</i>	J-95, incremento. Mezcla de hongos	2009
T2	<i>C. moschata</i>	Mezcla de hongos	2009
T3	<i>C. ficifolia</i>	Tipo fino, incremento. Semilla negra.	2003
T4	<i>C. argyrosperma</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	2004
T5	<i>C. pepo</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	2002
T6	<i>C. argyrosperma</i>	<i>Phytophthora</i>	2002
T7	<i>C. moschata</i>	<i>Fusarium</i>	2002
T8	<i>C. pepo</i>	<i>Phytophthora</i>	2004
T9	<i>C. pepo</i>	<i>Pythium</i>	2004
T10	<i>C. moschata</i>	<i>Phytophthora</i>	2004
T11	<i>C. moschata</i>	<i>Pythium</i>	2004
T12	<i>C. ficifolia</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	2004
T13	<i>C. ficifolia</i>	<i>Pythium</i>	2004
T14	<i>C. ficifolia</i>	<i>Fusarium</i>	2004
T15	<i>C. pepo</i>	Semilla original	1996
T16	<i>C. argyrosperma</i>	Mezcla de hongos	2004
T17	<i>C. moschata</i>	Mezcla de hongos	2009
T18	<i>C. pepo</i>	J-95, incremento, Mezcla de hongos	2009

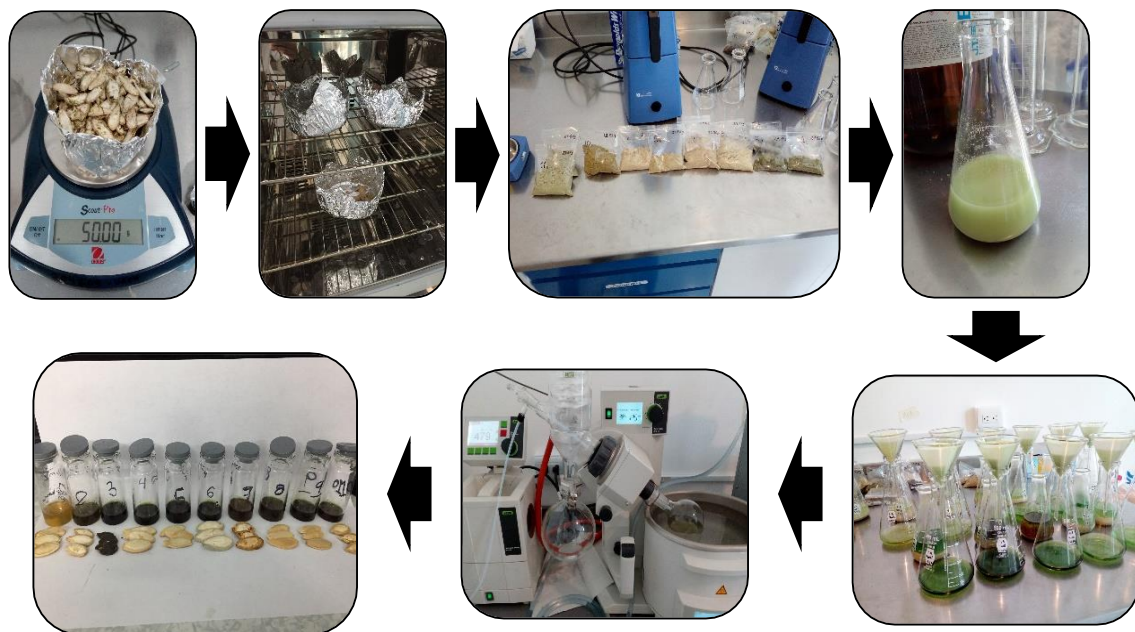


Figura 9. Metodología empleada para la extracción de muestras en solución orgánica (Cloroformo) a partir de semilla.

En matraces Erlenmeyer de 50 mL de capacidad se agregaron 20 mL de cloroformo grado reactivo además de la semilla molida, a mezcla se mantuvo en agitación constante durante 15 minutos. Transcurridos este tiempo, se filtró la mezcla con ayuda de matraces kitasato de 250 mL, embudos Buchner de porcelana (90 mm), así como papel filtro y una bomba de vacío, la cual permitió acelerar el filtrado de la suspensión. Obtenida la solución, ésta se sometió a un proceso de evaporación controlada con el fin de extraer el cloroformo utilizado y así poder obtener el extracto orgánico (Figura 9). La temperatura del baño fue de 60 °C y la presión base a la cual inició el proceso de evaporación fue de 474 mbar, disminuyendo esta última, manual y gradualmente, para asegurar la extracción total del solvente. Cabe aclarar que tanto la temperatura y la presión base a las que se configuró este instrumento son las recomendadas por el fabricante para el caso específico del cloroformo, puesto que forman parte de una cartera en el software del rotavapor.

3.4. Ensayo I. Espectroscopía de infrarrojo cercano (IRC) en muestras de semilla y extracto orgánico

Todas las determinaciones de espectros de IRC se llevaron a cabo con un equipo NIR-Bruker Optics Multi-Purpose Analyser (MPA), infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR), realizando un barrido en modo Absorbancia ($\log 1/\text{Transmitancia}$) de 900-2500 nm ($12000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), utilizando el módulo de esfera de integración, como modo de sampleo. Los extractos orgánicos de calabaza (sección 3.3) se analizaron directamente, sin tratamiento previo a través de la inserción de la muestra sobre viales de 22 mm de diámetro. En contraste, las diferentes semillas de calabaza se analizaron sin tratamiento previo, colocando las muestras sobre un spinner de cuarzo de 90mm de diámetro. Los scans de barrido de blanco se realizaron una vez cada 5 muestras analizadas. El aumento del reporte señal ruido se llevó a cabo en todos los casos, realizando un sampleo de 64 scans, todas a temperatura controlada de 28°C. La primera derivada de cada espectro IRC se realizaron considerando los primeros 13 puntos de inflexión.

3.5. Ensayo II. Pruebas de Resonancia Magnética Nuclear en muestras de extracto orgánico

Todos los experimentos ^1H -RMN fueron hechos en un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker 600 Avance III HD, con un campo magnético de 14.4 Tesla (correspondiente a una frecuencia de 600 MHz en ^1H). En consecuencia, los aceites extraídos de semilla se prepararon para análisis RMN a partir de la disolución de 100 μL de aceite de Cucúrbita, en 400 μL de Cloroformo Deuterado (CDCl_3). La solución CDCl_3 contiene una cantidad de alrededor de 0.1% de Tetra-metil-silano (TMS) como estándar interno para la calibración del desplazamiento químico.

El experimento ^1H -RMN por muestra, para obtención de perfiles metabolómicos (*vide infra*) fueron desarrollados en todos los casos con previa calibración de los parámetros más importantes (lock, shims, Receiver Gain, pulso de 90° (^1H), tiempo de recuperación de la magnetización entre scans, i.e. Recovery Delay, entre otros.) con los siguientes detalles experimentales: Un total de 64 transientes (Scans) se colectaron dentro de una matriz de adquisición de 42,306 puntos reales e imaginarios, con una ventana espectral de 9615 Hz, tiempo de recuperación entre scans de 5 segundos / scan y un tiempo de adquisición de la señal de inducción de caída libre (FID) de 2.2 segundos, produjeron tiempos experimentales por muestra de 6 minutos con 54 segundos.

Ninguna función de apodización fue utilizada durante la transformada de Fourier. Tanto la adquisición de datos como el procesamiento de los espectros se llevaron a cabo con los softwares Bruker Topspin 3.5 (Adquisición de datos) y Bruker Topspin 4.0 para procesamiento de FID, correcciones de fase espectral, correcciones de línea de base, alineamiento de espectros, binning (selección de señales para perfiles metabolómicos) y análisis.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Ensayo I. Espectroscopía de IRC en muestras de semilla y extracto orgánico

Los resultados de las pruebas de infrarrojo cercano en semilla para los cuatro grupos de especies se muestran en la Figura 10. De forma cualitativa, los cuatro grupos poseen espectros bien definidos con señales de diferente intensidad, dichas señales y sus diferencias poseen un potencial enorme en la diferenciación de especies o identificación de mejoras genéticas, pues existen diferencias bromatológicas en las muestras y pueden relacionarse directamente con las características intrínsecas de la misma. El rango de onda útil (de 3000 a 7000 cm^{-1}) permite apreciar los diferentes puntos de inflexión los cuales funcionan como una “huella digital” que se asocian directamente con la especie en cuestión. Los genotipos de la especie *pepo* son los que mantienen un comportamiento menos disperso a diferencia del grupo *moschata* el cual presentó la mayor variabilidad. Sin embargo, superponiendo todos los perfiles y tomando en cuenta un rango de onda útil (de 3000 a 7000 cm^{-1}) se aprecia de forma clara la diferencia cualitativa entre grupos de tratamientos. De esta manera, el grupo *pepo* presenta el mayor grado de intensidad en cuanto a señales, lo que sugiere una concentración bromatológica mayor, mientras que los grupos *argyrosperma* y *moschata* están solo un poco por debajo, cualitativamente el grupo *moschata* es el que posee una mayor variación entre los genotipos que lo componen. Dentro del grupo *ficifolia* se presenta una pérdida de la línea base que se debe básicamente a la calibración del equipo, la cual se encuentra fuera del rango útil de onda. Las señales de los genotipos 10 y 11 (resistencia a *Phytophthora* y *Pythium* respectivamente) dentro del grupo *moschata* y las señales de los tratamientos 4 y 16 (resistencia a Rhizoctonia y a la mezcla de hongos) poseen una mayor intensidad con relación a sus similares grupales.

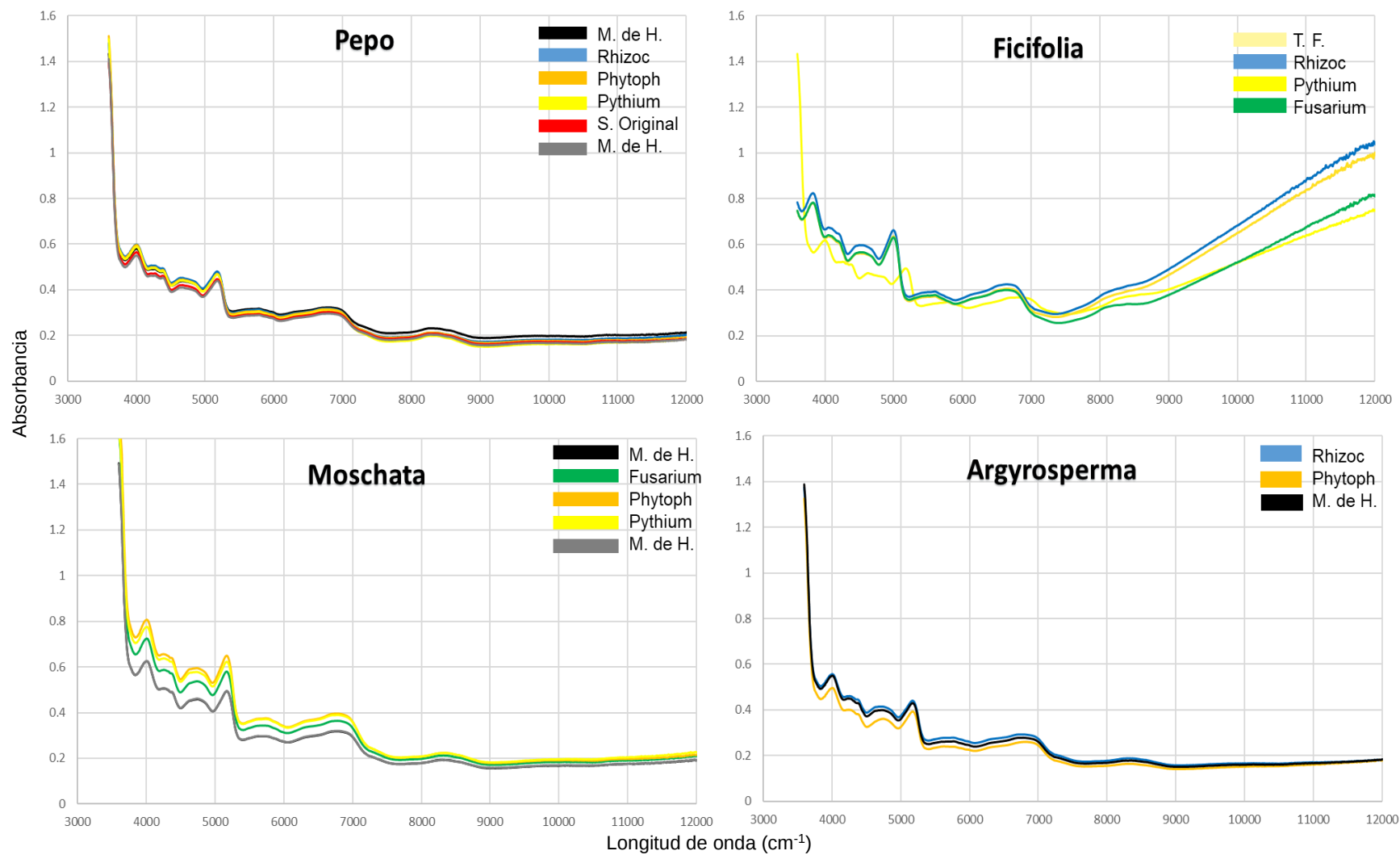


Figura 10 Prueba de Espectrometría de IRC en muestras de semilla de calabaza (*Cucurbita pepo*, *C. ficifolia*, *C. moschata* y *C. argyrosperma*)

Con relación a la prueba realizada al extracto orgánico con cloroformo, los resultados se muestran en la Figura 11. El rango de onda útil que para este caso es de 4500 a 8500 cm^{-1} y que, cualitativamente, permite localizar tres grupos de inflexión para los 18 perfiles, es diferente al de la prueba anterior. Por otro lado, gracias a esta prueba las diferencias entre perfiles y entre grupos se hace más amplia, pues las señales y los compuestos presentes en las muestras son diferentes (semilla y extracto con cloroformo). Para esta prueba se observa una diferencia más acentuada entre genotipos, que se explica básicamente por la naturaleza de la muestra. Sin embargo, al igual que en la prueba anterior, el grupo que aporta las señales más intensas y una menor diferencia entre sus genotipos es el grupo *pepo*. Las señales del grupo *moschata*, para esta prueba, tuvieron una variación menor con relación a la prueba anterior. Al interior del grupo *argyrosperma*, el genotipo 16 (resistencia a mezcla de hongos) es el que cualitativamente aporta señalamientos más en comparación con los dos materiales restantes. Algo muy similar sucede dentro del grupo *ficifolia* pues el tratamiento 12 (resistencia a *Rhizoctonia*) aporta las señales más bajas para ese grupo.

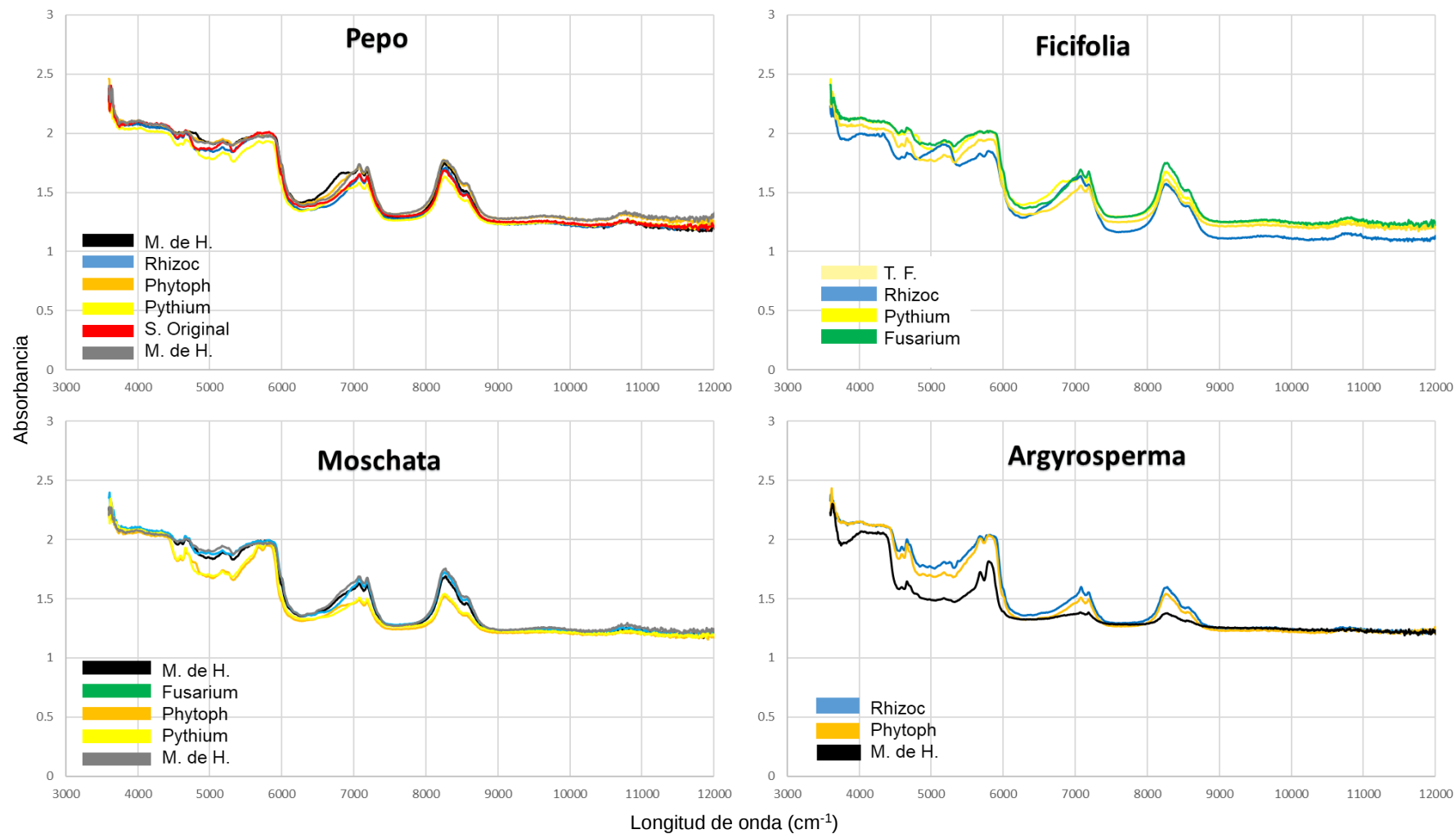


Figura 11 Prueba de Espectroscopía de IRC en muestras de extracto orgánico a partir de semillas de calabaza *Cucurbita pepo*, *C. ficifolia*, *C. moschata* y *C. argyrosperma*).

Los resultados de las funciones derivadas obtenidas a partir de las purebas de infrarrojo cercano en muestras de semilla se muestran en la Figura 12. Los perfiles metabólicos de este ensayo perciben cinco puntos de inflexión importantes los cuales permitieron destacar diferencias importantes entre todos los genotipos. Para este caso el rango útil de onda va de los 3800 a los 8500 cm^{-1} . El primer punto de inflexión para los cuatro grupos varía de 4077 a los 4088 cm^{-1} , mientras que el segundo varía de 4424 a los 4458 cm^{-1} , este punto presenta su mayor variabilidad para el grupo *moschata*. Gráficamente, el segundo punto de inflexión mantiene una longitud de onda constante para los cuatro grupos de especies pues oscila entre los 4077 y los 4088 cm^{-1} , pero representa una marcada particularidad, pues en este punto, todos los genotipos de las especies *pepo* y *argyrosperma* arrojan intensidades de señal más altas que los grupos restantes (*ficifolia* y *moschata*). El tercer punto de inflexión, es el que posee la mayor variabilidad en cuanto a intensidad de señales entre los grupos de especies y oscila entre los 7085 y 7110 cm^{-1} , además de que permite diferenciar la intensidad de señales entre los genotipos que integran al grupo *moschata*, el cual, concordando con las pruebas anteriores, es el que presenta una mayor variabilidad. Dentro del grupo *moschata*, el tratamiento 10 (resistencia a *phytophthora*) percibe su primer punto de inflexión a una absorbancia menor, al igual que el tratamiento 11 (resistencia a *Pythium*), por otro lado, los tratamientos 2 y 17 (ambos resistentes a la mezcla de hongos) poseen un perfil muy similar. Las especies *ficifolia* resistentes a *Rhizoctonia* y *Fusarium* (T12 y T14, respectivamente) tuvieron una baja intensidad de señal para todos los puntos de inflexión.

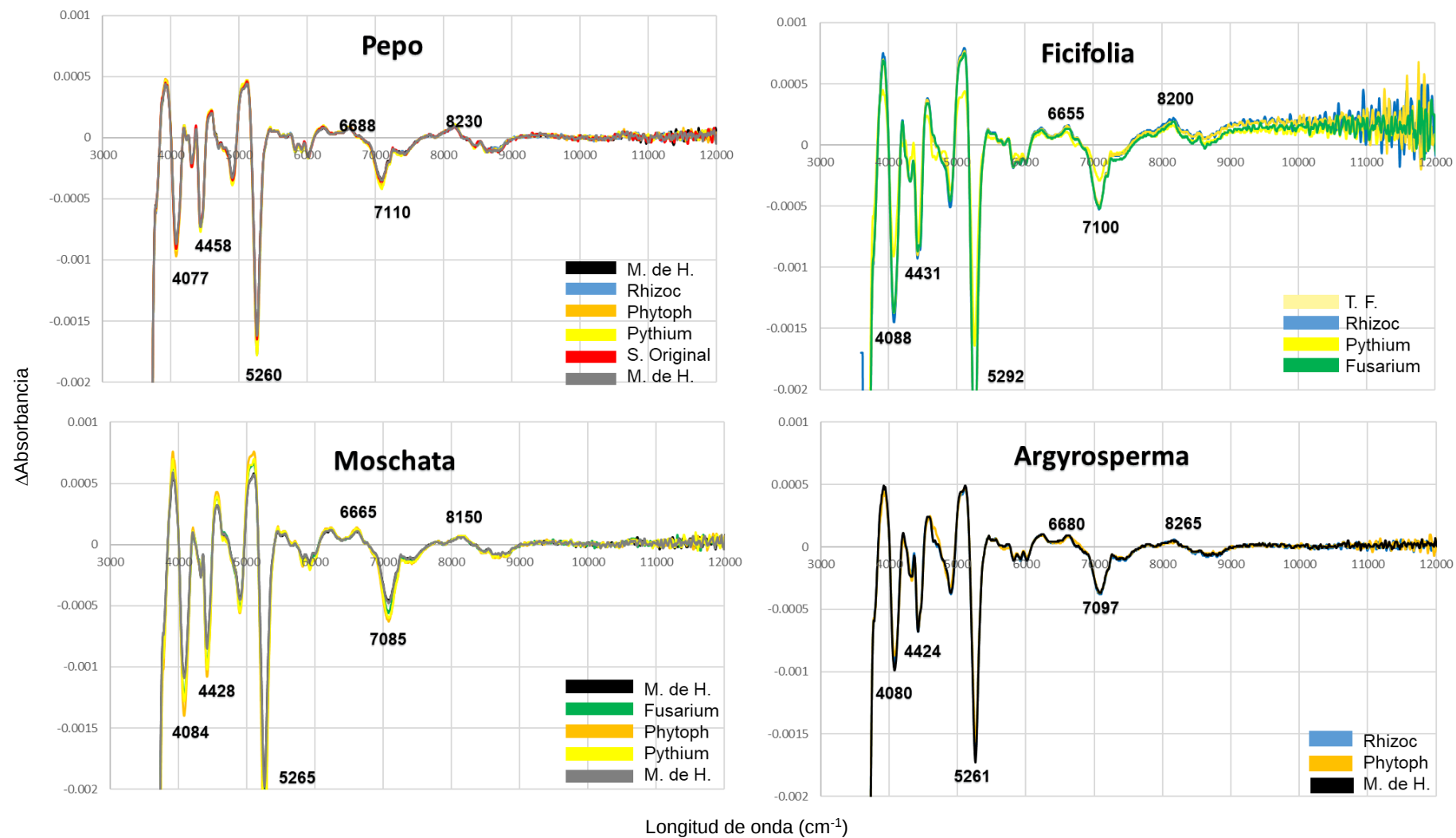


Figura 12 Primera derivada de las funciones obtenidas a partir de Espectroscopía de IRC en muestras de semilla de calabaza (*Cucurbita pepo*, *C. ficifolia*, *C. moschata* y *C. argyrosperma*).

Para el caso de la primera derivada de los datos obtenidos por IRC en extracto orgánico (Figura 13), podemos mencionar que el primer punto de inflexión en los cuatro grupos de especies se encuentra 3645 y los 3664 cm^{-1} . Mientras que el segundo punto de inflexión tiene una mayor variabilidad entre grupos de especies y varía desde 4447 a 4505 cm^{-1} . Los puntos de inflexión 2, 3 y 4, proporcionan evidencia gráfica de variabilidad entre grupos de especies, así como al interior de estos grupos. Para el caso del grupo *pepo* se muestra una marcada diferenciación del T15 (semilla original) pues la intensidad de señal para los puntos de inflexión 2 y 3 fueron más bajas en comparación con los genotipos resistentes a la mezcla de hongos (T1 y T18). Además, se aprecia una diferencia muy marcada en el tercer punto de inflexión de este grupo pues el genotipo resistente a *Pythium* (T9) lo presenta hasta los 4833 cm^{-1} . Al interior del grupo *ficifolia* se observa una marcada diferencia en los puntos de inflexión 1, 2, 3 y 4 ya que el genotipo resistente a *Fusarium* (T14) presentó una intensidad de señal más alta, sobresaliendo del grupo. Para el grupo *moschata* sucede algo similar a lo anterior ya que los genotipos resistentes a la mezcla de hongos (T2 y T17) aportan señales con mayor intensidad para todos los puntos de inflexión excepto el punto 5. Al interior del grupo *moschata* resalta la baja intensidad de señal para el segundo y tercer punto de inflexión por parte de los tratamientos resistentes a *Phytophthora* y *Pythium* (T10 y T11, respectivamente). En lo que respecta al grupo *argyrosperma*, el genotipo resistente a la mezcla de hongos (T16) aporta intensidades de señal mucho más bajas que las líneas resistentes a *Rhizoctonia* y *Phytophthora* (T4 y T6), mientras que estos dos últimos tratamientos tienen una intensidad de señal más baja en los puntos de inflexión 3, 4 y 5.

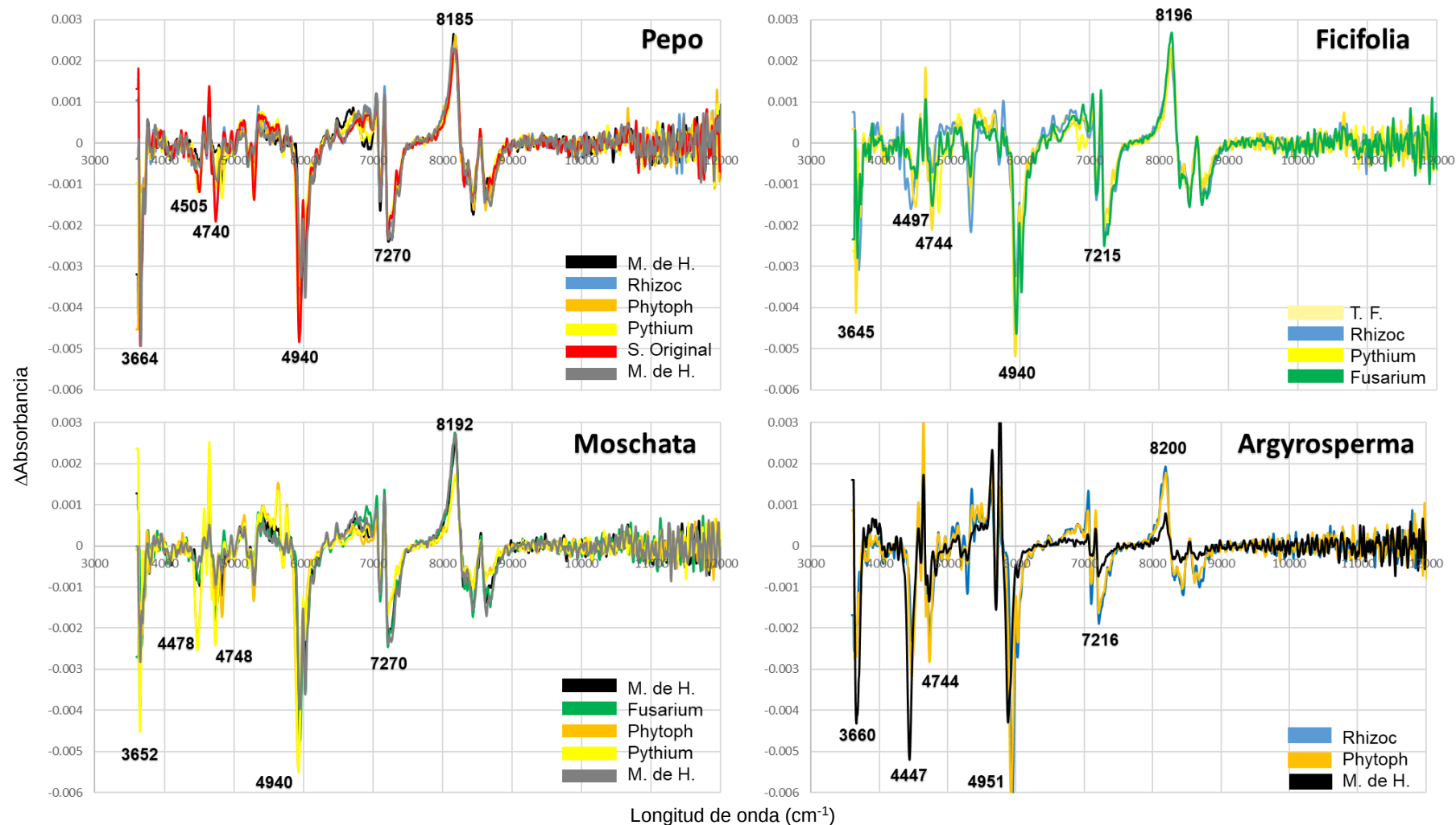


Figura 13 Figura 13 Primera derivada de las funciones obtenidas a partir de Espectroscopía de IRC en muestras de extracto orgánico (CHCl_3) de calabaza (*Cucurbita pepo*, *C. ficifolia*, *C. moschata* y *C. argyrosperma*).

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en las pruebas de determinación de ácidos grasos y proteína para los 18 materiales genéticos en estudio (Figura 14). De manera general, la concentración de grasa en semillas de calabaza no rebasa el 10 %, la concentración de proteína se encuentra entre un rango del 20 al 30% y solo en los grupos *pepo* y *ficifolia* se encontraron lecturas de proteína en el extracto orgánico para todos los integrantes de grupo. Los resultados arrojados también proporcionan una corroboración sobre el comportamiento del grupo *pepo* pues es el que mantiene un comportamiento más uniforme por sus integrantes, los contenidos proteicos para este grupo oscilan entre un 25 a 28 % en semilla, pero se ven incrementados cuando se habla del extracto orgánico pues todas las especies *pepo* oscilaron entre un 38 a 70% de proteína.

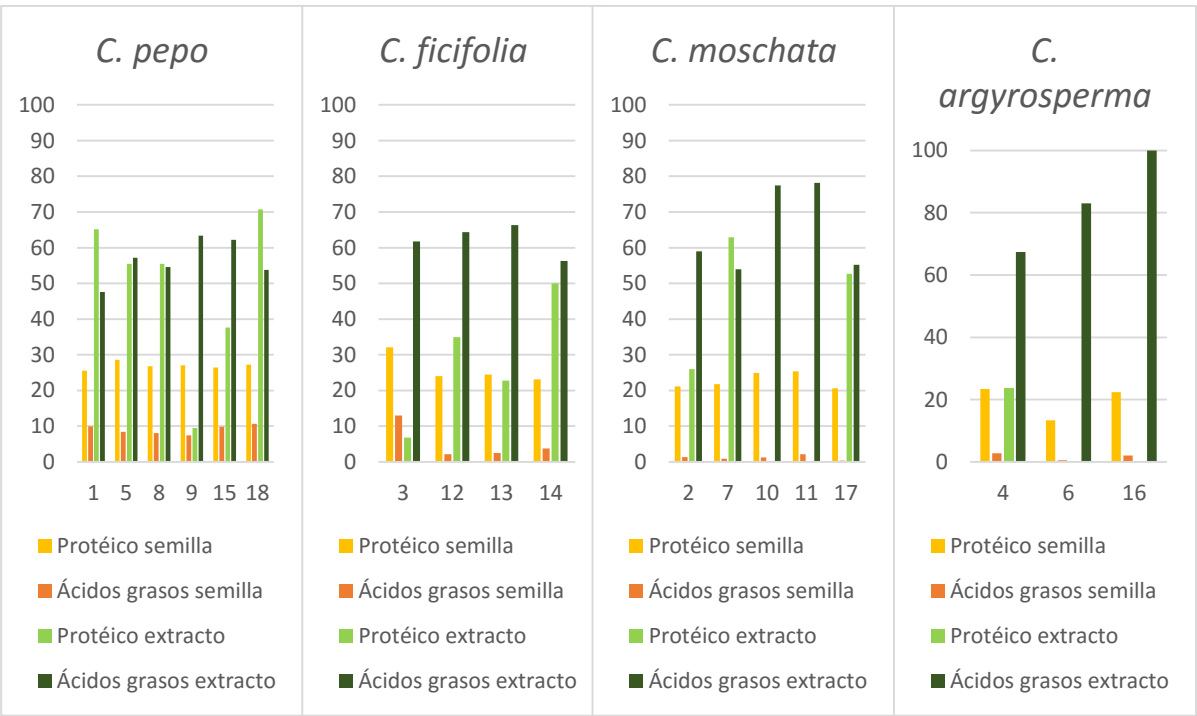


Figura 14 Porcentajes de ácidos grasos y proteína en semillas de calabaza, muestras de semilla y extracto orgánico.

4.2 Ensayo II. Pruebas de RMN en muestras de semilla y extracto orgánico

Como puede apreciarse en la Figura 15, los extractos orgánicos de *Cucurbita pepo*, *C. moschata*, *C. ficifolia*, y *C. argyrosperma* presentan ácido linoléico como componente principal de los extractos, pues la identidad de los espectros ^1H -RMN de extractos orgánicos de diferentes variedades de calabazas, respecto al espectro ^1H -RMN de ácido linoléico es evidente. Sin embargo, son los metabolitos de menor intensidad que permiten hacer las distinciones entre una huella metabolómica propia de la especie Cucúrbita y diferencias entre las variedades analizadas.

La distinción de la especie Cucúrbita por ^1H -RMN es claramente indicada en la Figura 13. Las barras resaltan el cluster de señales que consecutivamente se aprecian en todos los espectros de protón analizados, a los siguientes desplazamientos químicos (con la siguiente multiplicidad): 1.5 ppm (multiplete); 2.55 ppm (triplete); 2.92 ppm (multiplete); 5.75 ppm (multiplete); 5.90 ppm (cuarteto); 6.15 ppm (doble de doble); 6.66 ppm (doblete); 6.88 ppm (singulete); 7.1 ppm (singulete); 7.49 ppm (doble de doble de doble); 7.79 ppm (multiplicidad variable según la variedad / mejora fitogenética) y 8.04 ppm (multiplete). Es importante resaltar que prácticamente la totalidad de espectros ^1H -RMN presentan entre 8.1-8.5 ppm un conglomerado de señales superpuestas que originan una resonancia con ancho de línea importante, que impide discernir el tipo de familias químicas que la originan. Por desplazamiento químico (8.1-8.5 ppm) se podría presumir la presencia de Hidrógenos aromáticos de ésteres triterpénicos (Kikuchi et. al., 2014). De manera general, la señal ancha entre 8.1-8.5 ppm es de mayor intensidad para las muestras testigo (semilla original) en *C. pepo*, así como las muestras con genotipos catalogado para mezcla de hongos, en todas las especies *C. pepo*, *C. moschata*, y *C. argyrosperma*.

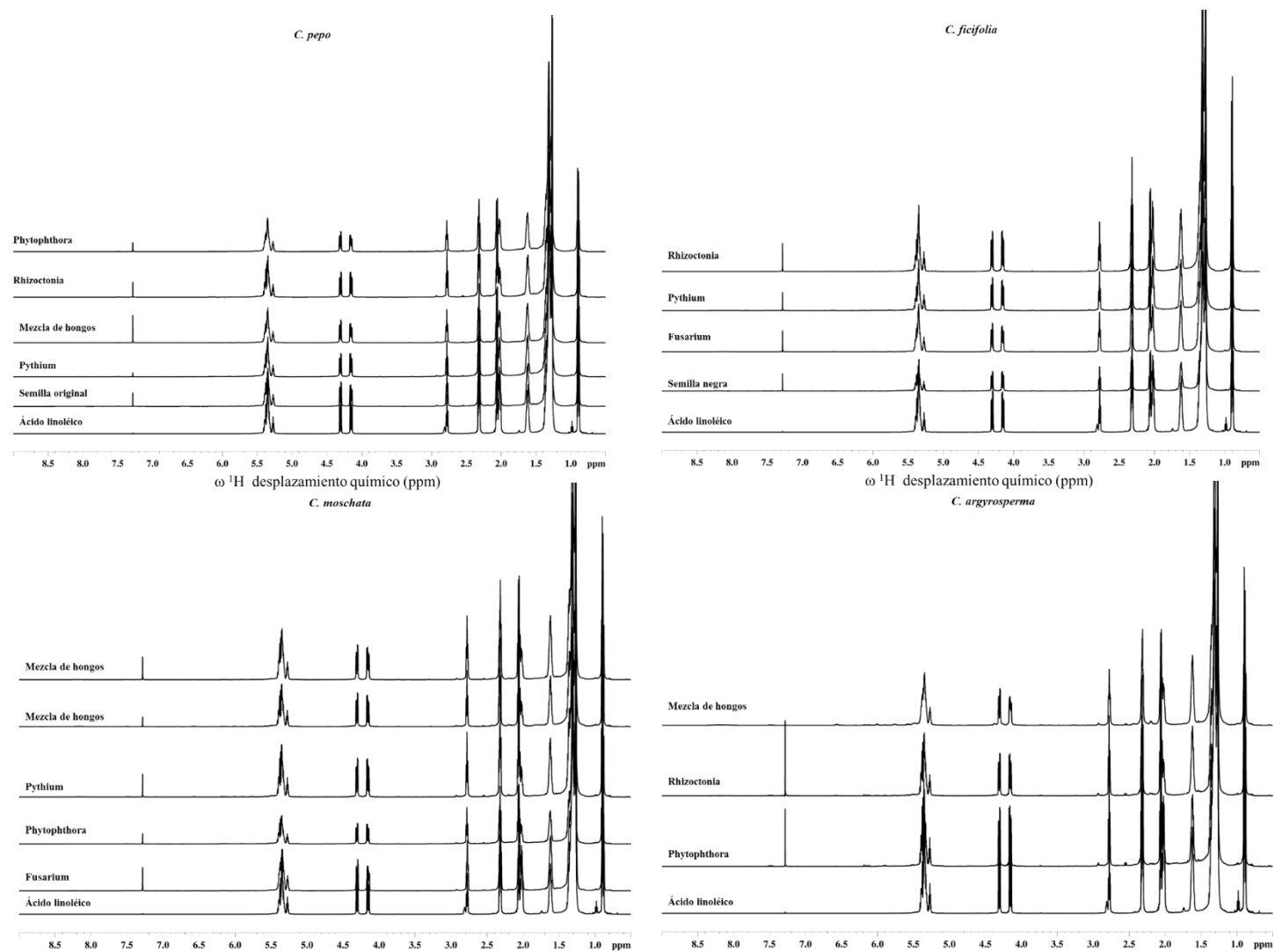


Figura 15 Espectro de ¹H-RMN de extractos orgánicos de Cucurbita pepo, C. moschata, C. ficifolia, y C. argyrosperma. Región de 9.5-0.5 ppm

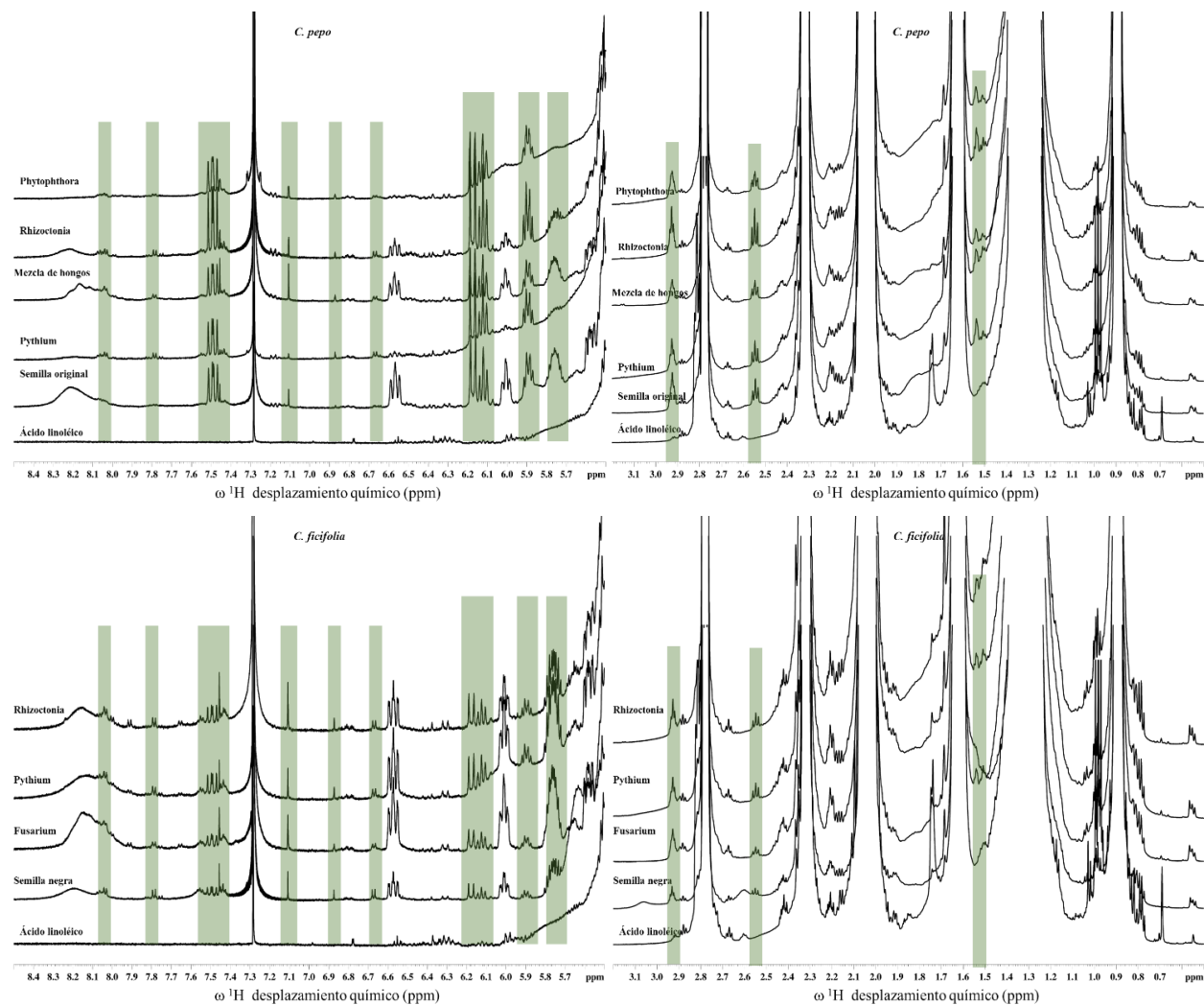


Figura 16 Espectro de ^1H -RMN de extractos orgánicos de *Cucurbita pepo*, *C. moschata*, *C. ficifolia*, y *C. argyrosperma*. Expansión de regiones entre 8.5-5.5 ppm y 3.2-0.5 ppm (parte 1)

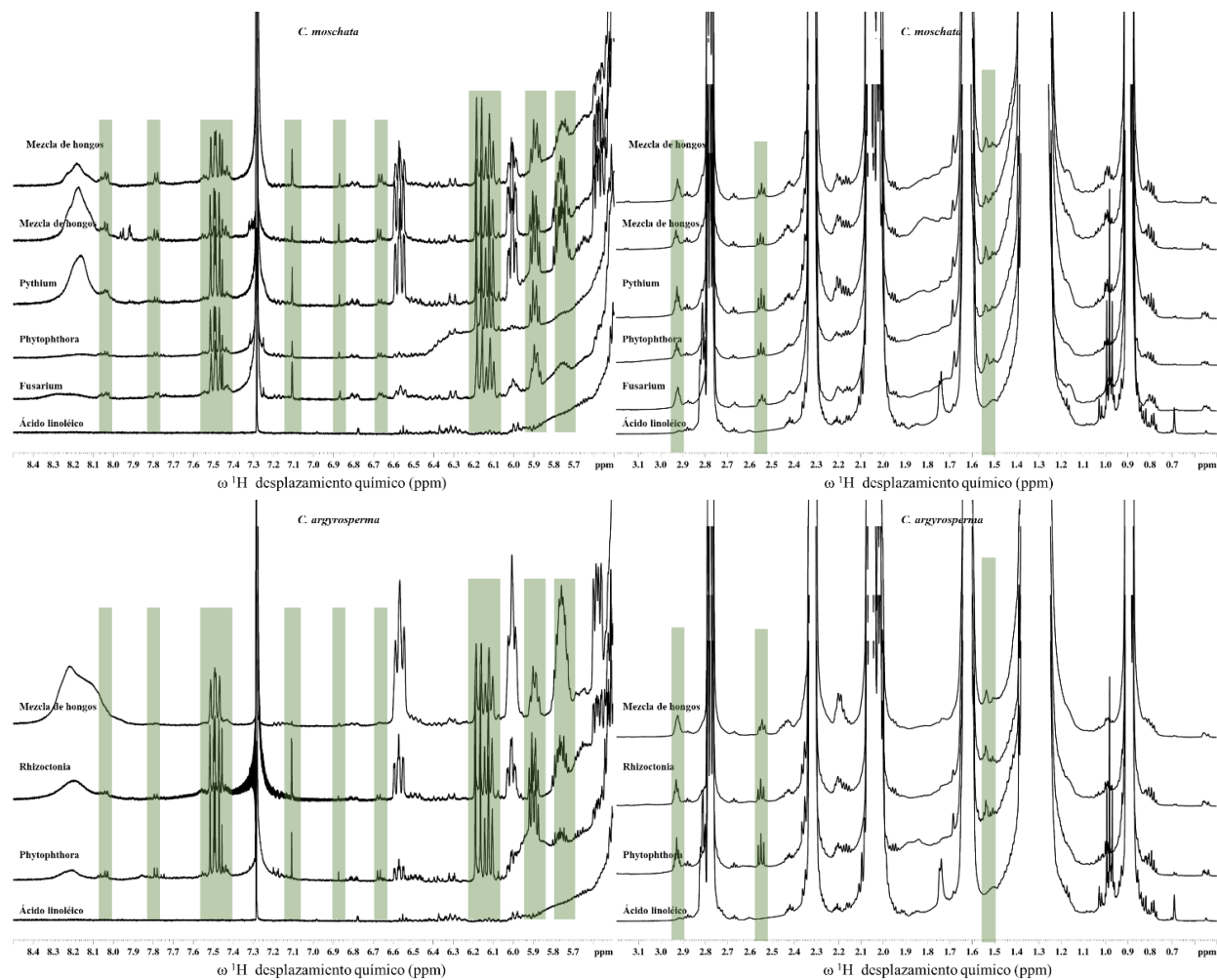


Figura 17 Espectro de ^1H -RMN de extractos orgánicos de Cucurbita pepo, *C. moschata*, *C. ficifolia*, y *C. argyrosperma*. Expansión de regiones entre 8.5-5.5 ppm y 3.2-0.5 ppm (parte 2)

De la misma manera se pueden discernir perfiles metabólicos ^1H -RMN, en función del genotipo, independiente de la especie. Algunos ejemplos de lo anterior comprenden:

1. Todas las variedades *Cucurbita pepo*, *C. moschata*, *C. ficifolia*, y *C. argyrosperma* poseen señal 5.75 ppm (multiplete), excepto aquellas variedades que presentan resistencia a *Phytophthora*.
2. La señal 6.0 ppm (multiplete), de igual forma presente en los espectros de ácido linoléico, se encuentra presente en cualquier variedad analizada, excepto en aquellas mejoradas hacia *Phytophthora*.
3. El menor reporte señal ruido detectado de manera sistemática de las señales 7.79 ppm (multiplicidad variable según la variedad / mejora fitogenética) y 8.04 ppm (multiplete), indudablemente la presentan todas las muestras con resistencia a *Pythium*.
4. La señal ancha entre 8.1-8.5 ppm (con ancho de señal de 95 Hz en promedio), presente en todas las especies y todos los genotipos, es de notable mayor intensidad para las muestras testigo (semilla original) en *C. pepo*, así como las muestras de genotipos catalogados como resistentes a la mezcla de hongos, en todas las especies *C. pepo*, *C. moschata*, y *C. argyrosperma*.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

Utilizando dos técnicas analíticas de espectroscopía diferentes (RMN e IRC) se crearon y contrastaron 18 perfiles metabolómicos de calabaza (*C. pepo*, *C. ficifolia*, *C. moschata* y *C. argyrosperma*) con diferentes niveles de resistencia a Damping off. Además, se identificaron ciertas diferencias asociadas a cada una de las especies en estudio. Se demostró por medio de RMN que la base del extracto orgánico elaborado con cloroformo es ácido linoleico pero cada línea presenta señales particulares que las diferencian entre sí. Gracias a la comparación del espectro del ácido linoleico se identificaron los caracteres distintivos de cada una de las líneas a manera de “huella dactilar” ya que cada espectro es diferente y posee características particulares. La primera derivada de los resultados obtenidos por espectroscopía de IRC para extractos y semillas muestra por lo menos cinco puntos de inflexión que permitieron identificar pequeñas diferencias bromatológicas entre los 18 perfiles, todo lo anterior nos ayuda a comprender un poco más el resultado de planes de mejoramiento genético a un nivel más profundo. Los resultados del análisis bromatológico (proteína y ácidos grasos) en semilla fortalecen todo lo antes mencionado por lo menos para el caso de *C. pepo* que fue la especie con menos variación en todos los estudios y en donde se encontró de un 25 a 28% de proteína y alrededor del 10% de ácidos grasos, valores que aumentan notablemente en el extracto orgánico. El presente trabajo de investigación solo tiene como alcance un estudio metabolómico no dirigido y exploratorio que pudiese ser un parteaguas o el inicio de estudios metabolómicos dirigidos (detección y cuantificación) que permitieran, de manera rápida y sencilla, evaluar distintos parámetros bioquímicos en el germoplasma, técnica que pudiera aplicarse a una amplia gama de cultivos y productos agroalimentarios.

BIBLIOGRAFÍA

Kikuchi, T.; Ueda, S.; Kanazawa, J. (2014). Three new triterpene esters from pumpkin (*Cucurbita maxima*) seeds. *Molecules*. 19, 4802-4812.