

Proteína inhibidora de la poligalacturonasa en manzana mexicana (*Malus domestica* Borkh)

Mexican apple (*Malus domestica* Borkh) polygalacturonase inhibitor protein

VÍCTOR MANUEL GUERRERO-PRIETO^{1,3,4}, DAVID IGNACIO BERLANGA-REYES¹,
PAUL BARUK ZAMUDIO FLORES¹ Y ESTEBAN SÁNCHEZ-CHÁVEZ²

Recibido: Febrero 2, 2011

Aceptado: Septiembre 12, 2011

Resumen

La poligalacturonasa (PG) es una de las enzimas responsables de la pérdida de firmeza de la manzana. La determinación de la presencia y actividad de la proteína inhibidora de la poligalacturonasa (PIPG) es información de alta relevancia como base para otros trabajos, como los relacionados a la incidencia y severidad de enfermedades fúngicas en poscosecha, como información básica para su control. Con esta finalidad, se determinó la presencia y actividad de la PIPG en frutos de manzana por medio de un análisis de difusión radial, determinando también índices de madurez y contenido de proteínas totales. Los 20 frutos de cada cultivar, provenientes de una huerta comercial en Cuauhtémoc, Chihuahua, se cosecharon por fecha, pizcando al azar, bajo un diseño experimental completamente al azar. Los valores de mayor actividad de la PIPG, se presentaron en el mes de septiembre y fueron: 'Golden Delicious' 4.14 U, 29 de septiembre, 2009; 'RedChief Delicious' 3.21 U, 15 de septiembre, 2009 y 'Rome Beauty' 5.81 U, 22 de septiembre, 2009. El contenido de proteínas totales para 'Golden Delicious' fue 3.06 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; para 'RedChief Delicious', 2.56 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y para 'Rome Beauty', 2.14 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Los tres cultivares mostraron presencia y actividad de la PIPG durante todo el periodo de maduración de la fruta. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en actividad entre cada cultivar. El objetivo de este estudio fue identificar la presencia y actividad de la PIPG durante la maduración de la manzana en los cultivares evaluados.

Palabras clave: etileno, índices de madurez, PIPG, proteínas totales.

Abstract

Polygalacturonase (PG) is one of the enzymes responsible for apple fruit firmness loss, therefore, the determination of the presence and activity of polygalacturonase inhibitor protein (PGIP) is highly relevant information for those studies related to incidence and severity of postharvest fungal diseases and their control. PGIP presence and activity were determined on apple fruit by a radial diffusion analysis, maturity indexes and total protein content were also quantified. Twenty apple fruits of each cultivar were sampled from a commercial orchard in Cuauhtémoc, Chihuahua, Mexico. Apple fruits were sampled by date, picking them at random, under a completely randomized experimental design. Highest activity values for PGIP occurred in September, they were: 'Golden Delicious' 4.14 U, September 29th, 2009, 'RedChief Delicious' 3.21 U, September 15th, 2009 and 'Rome Beauty' 5.81 U, September 22nd, 2009. Total protein contents were; for 'Golden Delicious' 3.06 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, for 'RedChief Delicious' 2.56 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and for 'Rome Beauty' 2.14 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. The three evaluated cultivars had PGIP presence and activity, which was detected during the whole maturation period. No statistically significant differences in activity among cultivars were observed. The objective for this study was to identify the presence and activity of PGIP during the apple fruit maturation period on the evaluated cultivars.

Keywords: ethylene, maturity indexes, PGIP, total proteins.

¹ Fisiología y Tecnología de Alimentos de la Zona Templada. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Av. Río Conchos s/n, Parque Industrial. Apdo. Postal 781. Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Tel. 01(625)581-29-20.

² Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Delicias. Ave. 4ª Sur, 3820. Delicias (Chihuahua). México.

³ Dirección electrónica del autor de correspondencia: vguerrero@uach.mx.

⁴ Adscripción actual del autor de correspondencia: Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Campus Cuauhtémoc, Chih. Av. Presa La Amistad # 2015, Cuauhtémoc, Chih. C. P. 31510 Tel. 01(625)581-06-47

Introducción

Los vegetales presentan diferentes mecanismos de defensa contra el ataque de los fitopatógenos. Uno de estos mecanismos es la barrera física que representa la pared celular, compuesta por un complejo de polisacáridos y proteínas estructurales y que es el primer punto de defensa del tejido vegetal contra la invasión de patógenos.

La pectina es el polisacárido estructural más abundante en la lámina media y pared celular primaria y está compuesta por polímeros del ácido D-galacturónico enlazados por grupos carboxilo con cationes divalentes como calcio y magnesio (González *et al.*, 2007; Jurick II *et al.*, 2009). Otro mecanismo es el relacionado con las poligalacturonasas (PG) y la proteína que las inhibe (PIPG). Las poligalacturonasas, que se encuentran en la membrana celular, son las enzimas responsables de la degradación de la pared celular en los tejidos vegetales y entran en acción de manera natural durante el periodo de maduración de la manzana, degradando las pectinas de la lámina media y de la pared celular y también son producidas por casi todos los hongos fitopatógenos durante la infección (Cook *et al.*, 1999; De Lorenzo *et al.*, 2001, Fish y Davis, 2004, Gomathi y Gnanamanickam, 2004, Protsenko *et al.*, 2010,). Las PG rompen los enlaces glucosídicos β -1,4 entre los residuos adyacentes de ácido poligalacturónico (Niture, 2008). Se ha encontrado actividad de esta enzima en tejido de manzana y pera inoculados con *Penicillium* spp. (Gomathi y Gnanamanickam, 2004, Jurick II *et al.*, 2009, Jurick II *et al.*, 2010). Un gran número de frutos como manzana, pera, uva y naranja entre otros, poseen la capacidad de producir proteínas extracelulares que inhiben la actividad de las poligalacturonasas de manera natural (Stotz *et al.*, 2000, De Lorenzo *et al.*, 2001, Al-Obaidi *et al.*, 2010). La identificación y cuantificación de la PIPG es necesaria como base para la obtención y purificación de estas glicoproteínas, para luego continuar con trabajos de identificación y obtención del gen o genes responsables de la producción de estas proteínas (Arendse, *et al.*, 1999, Fish y Madihally, 2004a, Fish y Davis, 2004b, Oelofse *et al.*, 2006,

Shivashankar *et al.*, 2010, Al-Obaidi *et al.*, 2010). Los resultados de los trabajos efectuados en el presente trabajo, serán orientados al control de hongos fitopatógenos, como *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*, en manzana en poscosecha. La hipótesis que se planteó fue: la proteína inhibidora de la poligalacturonasa está presente y activa en los tres cultivares evaluados, y el objetivo del presente trabajo fue identificar la presencia y actividad de la proteína inhibidora (PI) de la PG en manzana 'Golden Delicious', 'RedChief Delicious' y 'Rome Beauty' en la región de Cuauhtémoc, Chihuahua.

Materiales y métodos

Cultivares y fechas de muestreo. Los frutos de manzana utilizados fueron cosechados de un huerto comercial localizado en la región de Cuauhtémoc, Chihuahua, México (28° 06' Latitud N y 106° 58' Longitud O). Se recolectaron 20 frutos de cada uno de los tres principales cultivares de la región: 'Golden Delicious', 'RedChief Delicious' y 'Rome Beauty', los días 17 y 25 de agosto y el 1, 8, 15, 22 y 29 de septiembre del 2009, excepto en 'Rome Beauty', en la que no se muestreó el 29 de septiembre, debido a que no había disponibilidad de fruta. La edad de los árboles fue de 15 años para los tres cultivares evaluados. El grado de madurez de los frutos al momento de los diferentes muestreos se indica en el Cuadro 1. Los frutos se cosecharon de cinco árboles, pizcando de la parte media de la copa de cada árbol.

Índices de madurez de la manzana. En cada fecha de muestreo, a 10 manzanas se les determinó el diámetro ecuatorial y polar (mm), utilizando un vernier Cranston, el peso en g (balanza digital Ohaus), la firmeza de la pulpa, en N (analizador de textura TA-XT2i,

Texture Technologies Corp. EUA. El émbolo utilizado fue de 11 mm de diámetro, con una penetración de 10 mm hacia el interior de la fruta), el contenido de sólidos solubles totales, °Brix (refractómetro Atago ATC-1E, 0-32 °Brix, Japón), el índice de almidón (se cuantificó mediante la tinción en una solución Lugol, yodo y yoduro de potasio, de una rodaja de pulpa de la fruta. La rodaja se dejó reposar dos minutos, se retiró de la solución y se dejó secar por 24 horas, para posteriormente evaluar el resultado), la producción interna de etileno (cromatógrafo de gases Varian 3800, equipado con detector de ionización de flama (FID) y una columna empacada Haysep Q 1.8 m x 1/8" x 2 mm, (EUA). La cantidad de gas que se le inyectó al cromatógrafo fue de 0.2 ml, teniendo como gas acarreador al Helio. La columna se encontraba en un rango de temperatura de 60-90 °C) y el color de la cáscara de la fruta en escala L, a y b (CIE, Commission Internationale d'Eclairage, L*, a* y b*, utilizando un colorímetro triestímulo Minolta CR300, Japón), transformando los valores de a y b a tono (hue, °h, °h=arco tan b*/a*) y a croma (chroma, C, C= a*² +b*²). Para los índices de madurez no destructivos se utilizaron frutos completos.

Obtención del extracto crudo para determinar la actividad de la PIPG. De las frutas muestreadas en cada fecha, se obtuvo una muestra representativa de 250 g de pulpa, obteniendo 25 g de pulpa de cada uno de 10 frutos, que se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a una temperatura de -80 °C para su posterior análisis enzimático. Se homogenizó 0.5 g de muestra de pulpa de manzana con 0.5 mL de buffer de acetato de sodio (1M de acetato de sodio, pH 6.0, ácido acético 1M, 5.84 g de cloruro de sodio, 1 g de polivinilpirrolidona, PM 40,000 y 0.2 g de bisulfito de sodio). Se agitó la muestra durante 1 hr en hielo (~ 0 °C). La mezcla se centrifugó (Eppendorf centrifuge 5417 C) durante 20 min a 15,000 g. Se almacenó el sobrenadante (fracción I) a 0 °C hasta su uso. Se resuspendió el precipitado de la fracción I en 1 mL del buffer de acetato de sodio, agitando durante una hora

a 0 °C. Se centrifugó el resuspendido a 15,000 g durante 20 min y se retiró el sobrenadante (fracción II). Mediante un agitador de vórtice (Fisher Scientific Modelo 232, push tone), se combinaron las fracciones I y II. La mezcla de fracciones se dializó a 0 °C mediante una membrana con tamaño de poro de 12000 Daltons contra una solución de acetato de sodio (10 mM, pH 6.0) durante 12 h, con un cambio de solución buffer a las 6 h. Se utilizó 1 L de buffer para la diálisis. Se almacenó el dializado a 0 °C, que fue utilizado posteriormente para el análisis de difusión radial (Stotz *et al.*, 1993, Jurick II, *et al.* 2009, Jurick II *et al.*, 2010).

Análisis de difusión radial para la determinación de la actividad de la PG-PIPG. En cajas petri (15 x 100 mm) se adicionó un gel de agarosa, que fue preparado mezclando en 1 L de acetato de sodio (100 mM con pH 5.0), 10 g de agarosa, 0.1 g de ácido poligalactourónico (SIGMA), 3.7 g de Na₂EDTA y 0.2 g de azida de sodio, llevando la mezcla a ebullición. En el gel de agarosa en cada caja, se hicieron, con un sacabocados, cuatro pozos de 2 mm de diámetro cada uno, distribuidos uniformemente, con orientaciones norte, sur, este y oeste.

Se preparó una solución testigo de poligalacturonasa (PG, 9032-75-11, SIGMA) mezclando 0.03 Unidades de la enzima con buffer de acetato de sodio (100 mM, pH 5.0). Para evaluar la actividad de la PG-PIPG, se mezcló cada muestra obtenida del dializado de manzana con la solución de PG en proporción 1:1. De esta mezcla, se adicionaron 20 µL en cada uno de los tres pozos en el gel de agarosa. Se utilizó como testigo en el cuarto pozo, una mezcla de 0.03 unidades de la enzima con buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5.0. Cada muestra se realizó por triplicado con tres repeticiones cada una. Una vez colocadas las soluciones en los pozos, en las cajas petri con el gel de agarosa, éstas se sellaron con parafilm, para ser colocadas dentro de una bolsa de plástico con toallas de papel húmedas para evitar la deshidratación, y se incubaron a 40 °C durante 20 h. Después de la incubación, se detuvo la actividad de la PG adicionando al gel

HCl (0.1 N) por 30 s y se enjuagó con agua destilada. Para su tinción, sobre el gel de agarosa se agregaron ~20 ml de una solución de rojo rutenio (al 1%), dejando reposar durante una hora. Posteriormente, se hicieron dos enjuagues con agua destilada para eliminar el colorante. Finalmente, se determinó la actividad de la PG midiendo el diámetro del halo sin teñir en cada uno de los pozos con las muestras. La actividad de la PG es proporcional al log del diámetro del halo (Dingle *et al.*, 1953, Abu-Goukh *et al.*, 1983). Para transformar mm de diámetro del halo de inhibición a Unidades de actividad de la PG, se utilizó la siguiente ecuación; $Y = 2.1107X + 2.5041$ ($r^2 = 0.96$), donde Y= a Unidades de la PG; X= valor del diámetro del halo de inhibición.

Determinación de proteínas totales en el extracto crudo. Se colocaron 5 g de pulpa de cada una de las muestras de manzana, previamente macerada en mortero, en tubos eppendorf de 2 mL de capacidad. Los tubos se mantuvieron constantemente a 4 °C. Se agregó 1 mL de acetato de sodio (50 mM, pH 5.0) a la pulpa. Se centrifugaron durante 15 min a 10000 g. Se filtró con papel filtro y se retiró el precipitado. Al sobrenadante se le adicionó acetona concentrada en una proporción 1:1. Las muestras se pasaron a un ultra congelador para bajar la temperatura a -20 °C. Se centrifugaron nuevamente a 12000 g durante 30 min. El sobrenadante se retiró para enjuagar el precipitado dos veces con acetona al 70%, para posteriormente agregar 2 mL de buffer de acetato de sodio (50 mM, pH 5.0). Se agitaron las muestras durante 15 s mediante agitador de vórtice. De cada solución, 800 µL se mezclaron con 200 µL de reactivo de Bradford. Se agitaron por 30 s y se pasaron a una cuveta de 1.5 mL de capacidad para la determinación de su absorbancia a 595 nm mediante un espectrofotómetro (Cary 1E UV-visible, EUA), (Bradford, 1976). Para la determinación de la concentración de proteínas totales en las muestras, se calcularon los resultados mediante la ecuación $y = 0.056x + 0.004$ ($R^2 = 0.99$), donde Y= Proteínas totales; X= valor de la muestra a calcular. Esta ecuación fue

generada con concentraciones conocidas (2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 µg/µl, albúmina de suero de bovino (Bio-Rad), en buffer de acetato de sodio. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

Diseño experimental y análisis estadístico. Los datos se analizaron bajo un diseño completamente al azar. Todas las muestras se realizaron por triplicado. La unidad experimental fue un fruto en los índices de madurez. Se realizaron análisis de varianza para la actividad de la PG-PGIP en Unidades de enzima y para proteínas totales en µg·g⁻¹ en peso fresco. El testigo para la actividad de la PG-PIPG fue el tratamiento en el que se aplicó una concentración de 0.03 unidades de PG con buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5.0, tratamiento contra el que se compararon los resultados de la actividad de la PG-PIPG. Para el resto de las variables, el análisis de varianza se realizó en las unidades correspondientes a cada variable analizada. Cuando se detectó diferencias estadísticas, las medias de tratamientos se separaron con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Resultados y Discusión

La evolución del proceso de maduración de las manzanas de los tres cultivares evaluados, se muestra en el Cuadro 1, en relación a los índices de madurez evaluados. Las manzanas 'Golden Delicious' desarrollaron el menor tamaño de los tres cultivares evaluados, generando con esto el menor peso también. Al final de los muestreos, los frutos presentaron menos firmeza que los otros dos cultivares; sin embargo, este cultivar presentó el mayor valor de grados Brix y la producción interna de etileno inició a registrarse hasta el día 15 de septiembre, 2009 (fruta fisiológicamente madura).

Las manzanas del cultivar 'RedChief Delicious' mostraron valores intermedios en los índices de madurez, ya que alcanzaron un tamaño y peso menor que 'Rome Beauty' (Cuadro 1), pero mayor que 'Golden Delicious', también la firmeza y los ° Brix fueron intermedios. La presencia de etileno se detectó al día 8 de sep 2009 (fruta fisiológicamente inmadura).

Los resultados para los índices de madurez para manzanas 'Rome Beauty', indican que el tamaño y peso fue mayor que los otros cultivares, también la firmeza; sin embargo, fue el que obtuvo menor cantidad de ° Brix. La presencia de etileno no se detectó en ningún muestreo, aunque el último muestreo no se realizó, debido a la ausencia de fruta. Los resultados de los índices de madurez evaluados, en los tres

cultivares, indican el proceso normal de la maduración, con aumentos y disminuciones en los índices correspondientes, por ejemplo los valores de la firmeza de la pulpa disminuyen durante el ciclo y los grados Brix aumentan en el mismo periodo.

El contenido de proteínas totales en cada cultivar durante el periodo de los muestreos se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Índices de madurez en manzanas 'Golden Delicious', 'RedChief Delicious' y 'Rome Beauty' en las diferentes fechas de muestreo. 2009.

Parámetro	17 ago			25 ago			1 sep			8 sep			15 sep			22 sep			29 sep		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
Diámetro ecuatorial (mm)	66.3 (2.0)	70.0 (3.2)	72.9 (4.3)	67.4 (3.7)	69.8 (3.9)	72.6 (3)	69.0 (2.9)	70.6 (3.1)	74.8 (3.1)	69.9 (5.8)	71.7 (2.5)	76.7 (3.8)	68.9 (3.5)	73.8 (3)	75.9 (1.1)	67.5 (1.8)	75.1 (3)	79.5 (3.8)	70.5 (3.2)	74.9 (3.6)	-
Diámetro polar (mm)	67.7 (2.7)	69.9 (2.7)	71.2 (3.9)	71.1 (3.0)	68.2 (2.4)	70.1 (2.4)	71.2 (3.4)	69.9 (3)	71.4 (3.5)	70.3 (5.3)	70.6 (2)	73.3 (3.6)	71.5 (3.1)	72.9 (4.3)	73.7 (3.9)	68.0 (2.1)	73.7 (2.6)	73.7 (3.5)	72.9 (7.3)	75.6 (4.1)	-
Peso (g)	128.8 (13)	149.8 (16)	158.8 (22.2)	148.8 (17)	144.6 (17.7)	156.4 (17.5)	151.1 (20.3)	154.3 (16.5)	169 (16.9)	157.3 (19.8)	159.9 (15)	173.2 (22.8)	153.5 (18.7)	174 (22.2)	178.8 (18.8)	131.3 (9.0)	187.3 (18.8)	198.1 (27.9)	159.7 (15.5)	196.1 (27.9)	-
Firmeza (N)	70.3 (3.1)	72.8 (4.3)	104.3 (7.1)	65.1 (3.3)	73.5 (6.4)	93.4 (6.6)	65.0 (4.1)	69.7 (3.6)	92 (11.3)	61.0 (2.3)	69.1 (4.0)	91.2 (11.3)	61.9 (3.5)	65.9 (2.4)	88.3 (7.3)	61.2 (1.9)	66.7 (5.5)	78.1 (5.3)	62.0 (4.8)	66.4 (5.7)	-
Sólidos Solubles (° Brix)	11.7 (0.9)	10.4 (0.6)	10.4 (0.5)	11.3 (1.0)	12.4 (0.6)	10.9 (0.6)	12.1 (0.7)	11.3 (1.2)	11.6 (0.9)	12 (1.0)	12 (0.6)	11.6 (0.5)	12.6 (1.0)	12.2 (1.2)	12.1 (0.5)	14.2 (1.0)	12.7 (1.1)	12.6 (0.5)	16.1 (0.9)	13.2 (1.0)	-
Índice de almidón	2.4 (0.9)	1.4 (0.3)	1.3 (0.3)	4.4 (0.5)	1.6 (0.3)	1.6 (0.4)	4.8 (0.6)	1.6 (0.2)	1.9 (0.2)	4.8 (0.4)	2.8 (0.4)	1.7 (0.5)	5.6 (0.5)	2.6 (0.8)	3 (0.5)	5 (0)	2.6 (0.7)	3.4 (0.7)	4.6 (0.4)	3.8 (0.9)	-
Etileno (ppm)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7.3 (21.5)	0 (0)	2.7 (8.0)	1.7 (3.3)	0 (0)	0.04 (0.1)	12.2 (28.7)	0 (0)	2.2 (1.9)	17.3 (19.2)	-
L	71.4 (1.3)	41.4 (2.3)	47.7 (3.2)	69.6 (1.5)	39.3 (2.6)	45.8 (2.4)	70.3 (1.0)	37.8 (1.6)	42 (1.4)	70.2 (1.1)	37.8 (1.6)	40.7 (1.1)	71.3 (1.1)	36.2 (1.9)	42.9 (3.2)	74.2 (1.8)	38.5 (2.1)	41.3 (3.6)	77.4 (1.0)	35.8 (1.4)	-
Chroma (C)	41.9 (1.2)	21 (21)	22.3 (1.8)	41.8 (0.6)	21.7 (2.0)	24.2 (1.1)	41.9 (1.4)	19.1 (1.5)	23.3 (1.8)	40.5 (0.7)	18.2 (4.6)	21.9 (2)	40.6 (0.8)	17.3 (2.7)	24.8 (1.4)	41.2 (1.1)	19 (4)	23.1 (1.6)	43.2 (1.3)	16.3 (3.5)	-
Hue (°h)	114.5 (1.3)	22.2 (5.2)	51.9 (14.5)	115.4 (0.7)	14.4 (4.9)	41.7 (11.2)	113.5 (1.3)	9.1 (3.7)	24.5 (3.8)	113.5 (0.8)	8 (4.8)	21.7 (3.4)	111.5 (1.9)	5.2 (4.7)	26.5 (10.7)	111.6 (2.2)	44.9 (109.8)	19.9 (10.7)	105.1 (2.6)	145.2 (179.8)	-

C1 = 'Golden Delicious'. C2 = 'RedChief Delicious'. C3 = 'Rome Beauty'. C3. () Desviación estándar. Sept. 29, no se dispuso de fruta para el muestreo.

Cuadro 2. Contenido de proteínas totales en pulpa de manzanas en los cultivares y fechas indicados. 2009.

Fecha	Proteínas totales (µg.g ⁻¹ de peso fresco)		
	'Golden Delicious'	'RedChief Delicious'	'Rome Beauty'
17 agosto	1.96 ns	1.76 ab*	0.92 ns
25 agosto	1.00	2.56 a	0.82
1 septiembre	3.06	0**	2.14
8 septiembre	0.56	0.80 ab	0.96
15 septiembre	2.06	0.58 ab	0.96
22 septiembre	0**	0.74 ab	0.32
29 septiembre	0.46	0.96 ab	***

* Medias con distinta letra en la misma columna, son estadísticamente diferentes al 5% por Tukey.
 ** No hubo lectura
 ***No se dispuso de muestra para esta determinación.

Cuadro 3. Actividad de la PG-PIPG en gel de agarosa, para tres cultivares de manzana. 2009.

Fecha	Unidades*		
	'Golden Delicious'	'RedChief Delicious'	'Rome Beauty'
17 agosto	0.9 b **	1.04 b **	1.86 b**
25 agosto	1.91 c	0.71 b	2.26 c
1 septiembre	0.59 b	0.00 b	0.82 b
8 septiembre	3.16 b	2.31 b	1.82 b
15 septiembre	0.86 b	3.21 b	1.92 c
22 septiembre	0.00 bc	2.59 b	5.81 c
29 septiembre	4.14 c	2.01 b	***

*U = cantidad liberada de azúcar reductor medido como Ácido D-galacturónico, a partir del Ácido Poligalacturónico por minuto a un pH de 5.0 a 30 °C
 **Medias con diferente letra, en la misma columna, son estadísticamente diferentes al 5% por Tukey.
 ***No se dispuso de muestra para esta determinación.

La actividad de la PG, y por lo tanto la actividad de la PIPG (debido a la metodología utilizada, que determina ambas actividades simultáneamente), se presenta en el Cuadro 3. Los valores que corresponden al testigo, 49.19 U, no se incluyen en el Cuadro 3, debido a que en cada fecha de muestreo los valores fueron prácticamente iguales, al utilizar la misma concentración conocida de PG como testigo en cada muestreo. El valor del testigo, 49.19 tiene la literal a, en la comparación de medias, en cada cultivar. El comportamiento de la actividad de la PG-PIPG fue similar en los tres cultivares, con mayores valores para el cultivar 'RedChief Delicious'. La cantidad de proteínas totales para cada cultivar fue variable durante el periodo muestreado, conservándose en el intervalo ente 0 y 3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ por peso fresco. Para el cultivar 'Golden Delicious', la actividad de la PG-PIPG varió de 0.90 U al inicio de los muestreos y 4.14 U al final de los mismos. Para 'RedChief Delicious' los valores de la actividad de PG-PIPG fueron mayores que en los otros dos cultivares evaluados, el intervalo de actividad se situó en 3.21 U como actividad máxima hasta 2.01 U al final de los muestreos. 'Rome Beauty' presentó una variación en la actividad de PG-PIPG de 1.86 U al inicio de la maduración y una actividad en el último muestreo con 5.81 U. La mayor actividad se presentó en el mes de septiembre, para los tres cultivares evaluados.

En 'Rome Beauty', el contenido de proteínas totales, presentó la tendencia de disminución, como la disminución presentada para la PG-PIPG, debido a que la fruta ya presentaba un estado de maduración más avanzado que al inicio de los muestreos. Al comparar la actividad de la PG-PIPG del testigo en todas las fechas de muestreo, se observó una reducción significativa de la actividad de la PG en el tejido de la manzana en los tres cultivares evaluados. Estos resultados indican la presencia de la PIPG en los tres cultivares evaluados. La presencia de la PIPG también se ha reportado en otros frutos, de manera natural y como respuesta al ataque de patógenos (Cook *et al.*, 1999, Yao *et al.*, 1999, Stotz *et al.*, 2000,

De Lorenzo *et al.*, 2001, Gomathi y Gnanamanickam, 2004). No se observó diferencia estadísticamente significativa entre las fechas de muestreo.

Conclusiones


La actividad de la PG-PIPG estuvo presente durante todo el periodo de maduración, con mayor actividad en el mes de septiembre, en los tres cultivares, con diferentes concentraciones y en diferentes fechas, en cada caso. La presencia de la PIPG puede representar una estrategia de defensa contra hongos fitopatógenos en los cultivares de manzana evaluados.

Agradecimientos

Al Sr. Emilio Rentería Torres (Frigoríficos «Arroyo Seco» y Empacadoras «El Cascabel», Cuauhtémoc, Chih.) por su valiosa colaboración al proporcionarnos la manzana necesaria para realizar esta investigación.

Literatura citada

- ABU-GOUKH, A. A., L. L. Strand, and J. M. Labavitch. 1983. Development-related changes in decay susceptibility and polygalacturonase inhibitor content of «Bartlett» pear fruit. *Physiological Plant Pathology* 23:101-109.
- AL-OBADI, J. R., Mohd -Yusuf, Y., Chin-Chong, T., Mhd-Noh, N., and Toman, R. Y. 2010. Identification of a partial oil palm polygalacturonase inhibiting protein (*EgPGIP*) gene and its expresión during basal stem rot infection caused by *Ganoderma boninense*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(46), pp. 7788-7797.
- ARENDESE, M. S., I. A. Dubery, and D. K. Berger. 1999. Isolation by PCR-based methods of a plant antifungal polygalacturonase-inhibiting protein gene. *Electronic Journal of Biotechnology* Vol.2 No.3 17-34
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Annals of Biochemistry* 72: 248-254.
- COOK, B. J., R. P. Clay, C. W. Bergmann, P. Alberheim, and A. G. Darvill. 1999. Fungal polygalacturonases exhibit different substrate degradation patterns and differ in their susceptibilities to polygalacturonase-inhibiting proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:703-711.
- DE LORENZO, G., R. D'Ovidio, and F. Cervone. 2001. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annual Review Phytopathology* 39:313-35.
- DINGLE, J., W. W. Reid, and G. L. Solomons. 1953. The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides II. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 4:149-155.

- FISH, W. W. and S. V. Madihally. 2004a. Modeling the Inhibitor Activity and Relative Binding Affinities in Enzyme-Inhibitor-Protein Systems: Application to Developmental Regulation in a PG-PGIP System. *Biotechnology Programs* 20, 721-727.
- FISH, W. W., and A. R. Davis. 2004b. The purification, physical/chemical characterization, and cDNA sequence of cantaloupe fruit polygalacturonase-inhibiting protein. *Phytopathology* 94:337-344.
- GOMATHI, V., and S. S. Gnanamanickam. 2004. Polygalacturonase-inhibiting proteins in plant defence. *Current Science*, Vol. 87, NO. 9, 1211-1217.
- GONZÁLEZ, A., E. Cedillo, y L. Diaz. 2007. Morfología y anatomía de las plantas con flores. *Publicaciones Universidad Autónoma de Chapingo*. México. 275 p.
- JURICK II, W., I. Vico, J. L. Mc Evoy, B. D. Whitaker, W. Janisiewicz, and W. S. Conway. 2009. Isolation, purification, and characterization of a polygalacturonase produced in *Penicillium solitum* decayed 'Golden Delicious' apple fruit. *Phytopathology* 99:636-641.
- JURICK II, W., I. Vico, V. L. Gaskins, W. M. Garret, B. D. Whitaker, W. Janisiewicz, and W. S. Conway. 2010. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase produced by *Penicillium expansum*-during postharvest decay of 'Anjou' pear. *Phytopathology* 100:42-48.
- NITURE, S. K. 2008. Comparative biochemical and structural characterization of fungal polygalacturonases. *Biologia* 63:1-19.
- OELOFSE, D., I. A. Dubery, R. Meyer, M. S. Arendse, I. Gazendam, and D. K. Berger. 2006. Apple polygalacturonase inhibiting protein1 expressed in transgenic tobacco inhibits polygalacturonases from fungal pathogens of apple and the anthracnose pathogen of lupins. *Phytochemistry* 67, 255-263.
- PROTSSENKO, M. A., E. A. Bulantseva, and N. P. Korableva. 2010. Polygalacturonase-inhibiting proteins in plant fleshy fruits during their ripening and infections. *Russian Journal of Plant Physiology* 57(3):356-362.
- SHIVASHANKAR, S., C. Thimmareddy, and T. K. Roy, 2010. Polygalacturonase inhibitor protein from fruits of anthracnose resistant and susceptible varieties of chilli (*Capsicum annuum* L). *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* Vol. 47, 243-248.
- STOTZ, H. U., J. G. Bishop, C. W. Bergman, M. Koch, P. Albersheim, A. G. Darvill, and J. M. Labavitch. 2000. Identification of target amino acids that affect interactions of fungal polygalacturonases and their plant inhibitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56:117-130.
- STOTZ, H. U., A. L. Powell, S. E. Damon, L. C. Greve, A. B. Bennett, and J. M. Labavitch. 1993. Molecular characterization of a Polygalacturonase Inhibitor from *Pyrus communis* L. cv. Bartlett. *Plant Physiology* 102:133-138.
- YAO, C. H., W. S. Conway, R. Ren, D. Smith, G. S. Ross, and C. E. Sams. 1999. Gene encoding polygalacturonase inhibitor in apple fruit is developmentally regulated and activated by wounding and fungal infection. *Plant Molecular Biology* 39:1231-1241. 

Este artículo es citado así:

Guerrero-Prieto, V. M., D. I. Berlanga-Reyes, P. B. Zamudio-Flores y E. Sánchez-Chávez. 2011: *Proteína inhibidora de la poligalacturonasa en manzana mexicana (Malus domestica Borkh)*. *TECNOCENCIA Chihuahua* 5(3): 140-147.

Resúmenes curriculares de autor y coautores

VÍCTOR MANUEL GUERRERO PRIETO. Terminó su licenciatura en 1975, año en que le fue otorgado el título de Ingeniero Fruticultor por la ahora Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la UACH. Realizó su posgrado en la Oregon State University en Corvallis, OR. EUA, donde obtuvo el grado de Master of Science en Horticultura en 1984 y el grado de Doctor en Ciencias en Agronomía por la New Mexico State University en la Cruces, N. M. EUA, en 1995. Desde este año 2011, se reincorporó a la FACIATEC en el Campus Cuauhtémoc, Chihuahua y posee la categoría de Profesor-Investigador ATA. Ha sido miembro del Sistema Nacional de Investigadores desde 1986 a 1990 (Candidato a Investigador Nacional) y actualmente es Investigador Nacional Nivel I, desde el 2002. Su área de especialización es la fisiología vegetal y de poscosecha, así como el control biológico de enfermedades poscosecha utilizando microorganismos. Ha dirigido 14 tesis de licenciatura, 8 de maestría y 6 de doctorado. Es autor de 37 artículos científicos, más de 60 ponencias en congresos, 1 libro y 2 capítulos de libro científicos; además ha impartido 9 conferencias por invitación y ha dirigido 7 proyectos de investigación financiados por fuentes externas. Es evaluador RCEA de proyectos de investigación del CONACYT (Fondos institucionales, mixtos y sectoriales), Fundación Produce Chihuahua, es revisor del seguimiento de los Fondos sectoriales SAGARPA-CONACYT Y DEL CyTED, Madrid, España y es árbitro de 9 revistas científicas de circulación nacional e internacional.

DAVID IGNACIO BERLANGA REYES. Terminó su licenciatura en 1992 en la Facultad de fruticultura, hoy Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Realizó un posgrado en el Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Texcoco, Estado de México, donde obtuvo el grado de Maestro en Ciencias especialista en fruticultura en el año de 1996. De 1996 a 2003 se desempeñó como asesor de producción en huertos comerciales de manzana. Del 2003 a la fecha labora en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. con el puesto de Técnico Titular "A". Es catedrático en la Facultad de Ciencia Agrotecnológicas. Es especialista en Fisiología y Nutrición Vegetal y Fisiología Poscosecha. Ha dirigido 2 tesis de licenciatura. Es autor de 5 artículos científicos. Ha participado en 12 Congresos Nacionales e Internacionales. Ha dirigido 3 proyectos de investigación financiados por fuentes externas.

PAUL BARUK ZAMUDIO FLORES. Realizó sus estudios de licenciatura en el Instituto Tecnológico de Acapulco, Acapulco, Guerrero, obteniendo en el título de Ingeniero Bioquímico en el año 2000. Terminó los estudios de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos en el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, perteneciente al Instituto Politécnico Nacional, en Yautepec, Morelos, en el 2005. En el año 2008 recibió el grado de Doctor en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos por Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, Yautepec, Morelos. Durante su trayectoria académica ha obtenido múltiples reconocimientos por alto desempeño académico. Ha sido distinguido por el Sistema Nacional de Investigadores (S.N.I.) del Conacyt como Investigador Nacional Nivel 1. Ha tenido una importante productividad científica, que incluye la publicación de artículos científicos en journals internacionales, así como la publicación de diversos artículos de divulgación. Actualmente es Investigador del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) Unidad Cuauhtémoc, donde es responsable de laboratorio de Carbohidratos, empaques y alimentos funcionales. Su área de investigación se enfoca en Carbohidratos, empaques y alimentos funcionales.

ESTEBAN SÁNCHEZ CHÁVEZ. Realizó sus estudios de licenciatura en la Universidad Autónoma Chapingo (Chapingo), obteniendo en 1992 el título de Ingeniero Agrónomo especialista en Fitotecnia. Terminó su programa de maestría en la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), otorgándosele en 1996 el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Productividad Frutícola. En el año de 2006, recibió el grado de Doctor en Ciencias especialidad Fisiología Vegetal por la Universidad de Granada (España). Actualmente es Investigador Titular y Coordinador del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) Unidad Delicias-Chihuahua, es miembro de comités editoriales de varias revistas y ha sido distinguido por el Sistema Nacional de Investigadores del CONACYT (S.N.I.) como Investigador Nacional Nivel 2; su productividad científica ha sido muy prolífica, ya que incluye la publicación de artículos científicos, libros, capítulos de libros, participación como ponente en congresos científicos nacionales e internacionales. Las principales áreas de su investigación son: fisiología del estrés en plantas, nutrición vegetal y fisiología poscosecha.