

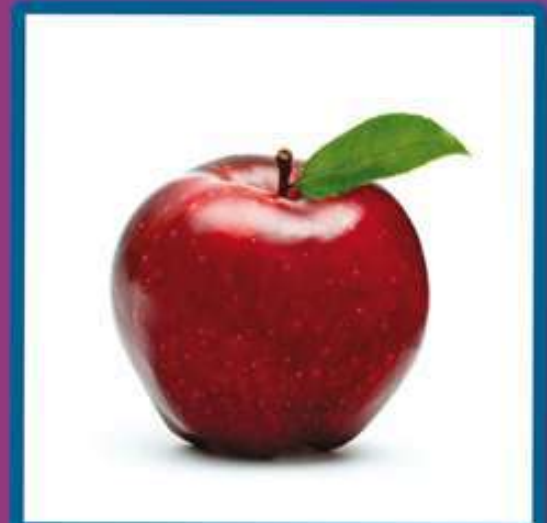
# TECNOLOGÍA CIENCIA

## Chihuahua

Revista de ciencia, tecnología y humanidades  
Universidad Autónoma de Chihuahua



El ácido giberélico incrementa la germinación prematura en el nogal pecanero (*Carya illinoensis* Koch.)



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



Capacitación a estudiantes de Ingeniería Mecánica en mecanizado de alta velocidad



Efectos por salinidad en el desarrollo vegetativo

latindex

PERIÓDICA

\$60.00  
Volumen V  
Número 3  
Sep-Dic 2011  
ISSN: 1870-6606





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
**CHIHUAHUA**

M.C. JESÚS ENRIQUE SEÁÑEZ SÁENZ  
*Rector*

M.D. SAÚL ARNULFO MARTÍNEZ CAMPOS  
*Secretario General*

LIC. SERGIO REAZA ESCÁRCEGA  
*Director de Extensión y Difusión Cultural*

DR. ROSENDO MARIO MALDONADO ESTRADA  
*Director de Planeación y Desarrollo Institucional*

DR. ALEJANDRO CHÁVEZ GUERRERO  
*Director Académico*

M.C. JAVIER MARTÍNEZ NEVÁREZ  
*Director de Investigación y Posgrado*

M.A.R.H. HORACIO JURADO MEDINA  
*Director Administrativo*

**TECNOCIENCIA**  
Chihuahua

**Comité Editorial Interno**

DR. CÉSAR HUMBERTO RIVERA FIGUEROA  
*Editor en Jefe*

**Editores asociados**

DRA. ALMA DELIA ALARCÓN ROJO  
DRA. ANA CECILIA GONZÁLEZ FRANCO  
DR. OSCAR ALEJANDRO VIRAMONTES OLIVAS

DR. JUAN OLLIVIER FIERRO  
DR. CARMELO PINEDO ÁLVAREZ  
DR. JAVIER TARANGO ORTIZ

DRA. LUZ HELENA SANÍN AGUIRRE  
DR. LUIS CÉSAR SANTIESTEBAN BACA  
DRA. MARÍA DE LOURDES VILLALBA

**Consejo Editorial Internacional**

DR. GUILLERMO FUENTES DÁVILA  
*Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México*

DR. VÍCTOR ARTURO GONZÁLEZ HERNÁNDEZ  
*Colegio de Posgraduados, México*

DR. JOHN G. MEXAL  
*New Mexico State University, Estados Unidos de América*

DR. ULISES DE JESÚS GALLARDO PÉREZ  
*Instituto de Angiología y Cirugía Vascular, La Habana, Cuba*

DR. HUMBERTO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ  
*Universidad Autónoma de Nuevo León, México*

DRA. ELIZABETH CARVAJAL MILLÁN  
*Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., México*

DR. ALBERTO J. SÁNCHEZ MARTÍNEZ  
*Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México*

DR. LUIS RAÚL TOVAR GÁLVEZ  
*Instituto Politécnico Nacional, México*

DR. LUIS FERNANDO PLENGE TELLECHEA  
*Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, México*

DR. HÉCTOR OSBALDO RUBIO ARIAS  
*Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México*

DRA. ANGELA BEESLEY  
*University of Manchester, Reino Unido*

DR. LUIS ALBERTO MONTERO CABRERA  
*Universidad de La Habana, Cuba*

DR. RICARD GARCÍA VALLS  
*Universitat Rovira I Virgili, España*

DR. LUIZ CLOVIS BELARMINO  
*Faculdade Atlantico Sul, Brasil*

M.E.S. NANCY KARINA VENEGAS HERNÁNDEZ  
*Asistente editorial - Abstracts*

M.S.I. IVÁN DAVID PICAZO ZAMARRIPA  
*Coordinador editorial*

L.S.C.A. MARTHA IVETTE ACOSTA CHÁVEZ  
*Diseño*

TECNOCIENCIA-Chihuahua. Revista arbitrada de ciencia, tecnología y humanidades. Volumen V, Número 3, Septiembre-Diciembre 2011. Publicación cuatrimestral de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Editor en Jefe: Dr. César Humberto Rivera Figueroa. ISSN: 1870-6606. Número de Reserva al Título en Derecho de Autor: 04-2007-0326610180900-102. Número de Certificado de Licitud de Título: 13868. Número de Certificado de Licitud de Contenido: 11441. Clave de registro postal PP08-0010. Domicilio de la publicación: Edificio de la Dirección de Investigación y Posgrado, Ciudad Universitaria s/n, Campus Universitario I, C.P. 31170, Chihuahua, Chihuahua, México. Oficina responsable de la circulación: Dirección de Investigación y Posgrado, Ciudad Universitaria, Campus Universitario I, C.P. 31170. Imprenta: Impresora Standar, Ernesto Talavera No. 1207, Teléfono 416-7845, Chihuahua, Chih. Tiraje: 1,000 ejemplares.

Precio por ejemplar en Chihuahua: \$ 60.00 Costo de la suscripción anual: México, \$ 200 (pesos); EUA y América Latina, \$ 35 (dólares); Europa y otros continentes, \$ 40 (dólares). La responsabilidad del contenido de los artículos firmados es de sus autores y colaboradores. Puede reproducirse total o parcialmente cada artículo citando la fuente y cuando no sea con fines de lucro.

Teléfono: (614) 439-1500 (extensión 2213); fax: (614) 439-1500 (extensión 2209), e-mail: tecnociencia.chihuahua@uach.mx  
Página web: <http://tecnociencia.uach.mx>

## Contenido

**Definición de la revista** **I**

**Editorial** **II**

### **El científico frente a la sociedad**

Capacitación a estudiantes de ingeniería  
mecánica en mecanizado de alta velocidad

*Raúl Armando Salas-Motis*  
*José Esparza-Elizalde*  
*Arturo Morales-Benavides*

**116**

### **Salud**

Cypermethrin, deltamethrin and glyphosate affect the  
activity of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase from human erythrocyte

*Javier Vargas-Medrano*  
*Jorge A. Sierra-Fonseca*  
*Manuel Arellano-Carrillo*  
*Fernando Plenge-Tellechea*

**121**

### **Alimentos**

Método para la extracción de ADN cloroplastídico  
de *Bouteloua gracilis* como herramienta para  
aplicaciones moleculares

*David I. Hernández-Quezada*  
*Sigifredo Arévalo-Gallegos*  
*David A. Betancourt-Guerra*  
*Armando Aguado-Santacruz*  
*Tania Siqueiros-Cendón*  
*Blanca Rivera-Chavira*  
*Guadalupe Virginia Nevárez-Moorillon*  
*Quintín Rascón-Cruz*

**132**

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

*Víctor Manuel Guerrero-Prieto*  
*David Ignacio Berlanga-Reyes*  
*Paul Baruk Zamudio Flores*  
*Esteban Sánchez-Chávez*

**140**

El ácido giberélico incrementa la germinación  
prematura en el nogal pecanero (***Carya***  
***illinoensis*** Koch.)

*Gerardo Martínez-Díaz*

**148**

### **Medio ambiente y desarrollo sustentable**

Efectos por salinidad en el desarrollo vegetativo

*Nallely Martínez Villavicencio*  
*Carlos V López Alonzo*  
*Moisés Basurto Sotelo*  
*Ramona Pérez Leal*

**156**

## Definición de la Revista *TECNOCENCIA Chihuahua*

TECNOCENCIA Chihuahua es una publicación científica arbitrada de la Universidad Autónoma de Chihuahua, fundada en el año 2007 y editada de forma cuatrimestral. Está indizada en:

- LATINDEX, Catálogo de revistas científicas de México e Iberoamérica que cumplen con criterios internacionales de calidad editorial.
- PERIODICA, la base de datos bibliográfica de la UNAM de revistas de América Latina y el Caribe, especializadas en ciencia y tecnología.
- CLASE, la base de datos bibliográfica de la UNAM de revistas de América Latina y el Caribe, especializadas en ciencias sociales y humanidades

### Objetivos

Servir como un medio para la publicación de los resultados de la investigación, ya sea en forma de escritos científicos o bien como informes sobre productos generados y patentes, manuales sobre desarrollo tecnológico, descubrimientos y todo aquello que pueda ser de interés para la comunidad científica y la sociedad en general. También pretende establecer una relación más estrecha con su entorno social, para atender a la demanda de los problemas que afectan a la sociedad, expresando su opinión y ofreciendo soluciones ante dicha problemática.

La revista *TECNOCENCIA Chihuahua* se publica cuatrimestralmente para divulgar los resultados de la investigación en forma de avances científicos, desa-

rollo tecnológico e información sobre nuevos productos y patentes. La publicación cubre las siguientes áreas temáticas: Alimentos, Salud y Deporte, Ingeniería y Tecnología, Educación y Humanidades, Economía y Administración, Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable, Creatividad y Desarrollo Tecnológico.

### Visión

Mejorar de manera continua la calidad del arbitraje de los artículos publicados en la revista, proceso que se realiza en forma anónima bajo el sistema de doble ciego. Conformar el Consejo Editorial Internacional y cada Comité Editorial por área del conocimiento de la revista, incorporando como revisores a investigadores del país y del extranjero adscritos a instituciones de Educación Superior y Centros de Investigación, que son reconocidos como académicos y científicos especializados en su campo.

### Tipos de escritos científicos

En la revista se publican las siguientes clases de escritos originales: artículos científicos en extenso, notas científicas, ensayos científicos y artículos de revisión.

### A quién se dirige

A científicos, académicos, tecnólogos, profesionistas, estudiantes y empresarios.

# Editorial

**E**n el tema “Capacitación a estudiantes de ingeniería mecánica en mecanizado de alta velocidad”, se discute una interesante propuesta educativa para mejorar el perfil profesional y formar al alumno de esta carrera, que requiere la industria aeroespacial. La investigación se basó en un análisis de mercado laboral, la realización de encuestas y entrevistas en empresas del sector de mecanizado. De acuerdo con los resultados del estudio, se recomienda incluir el manejo de software CAM (manufactura asistida por computadora, por sus siglas en inglés) en la capacitación del estudiante.

Es de todos conocido que la exposición a los agroquímicos, particularmente a los pesticidas, daña seriamente la salud del hombre y al ecosistema. Por lo antes expuesto, resulta de sumo interés el artículo: “Cipermetrina, deltametrina y glifosfato afectan la actividad enzimática de la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa de eritrocito humano”, donde los autores demuestran el efecto inhibitorio (deltametrina) y estimulante (cipermetrina y glifosfato) sobre la citada enzima, lo cual afecta los mecanismos regulatorios del calcio a nivel celular.

En este fascículo se analiza la implementación de un método mejorado para la extracción de cpADN del cloroplasto de *Bouteloua gracilis*, diseñado al combinar diversas estrategias de extracción conocidas y etapas convenientes para la especie. La incorporación de un paso adicional del lavado con CTAB incrementó la cantidad de ADN de buena calidad. En el artículo “Proteína inhibidora de la poligalacturonasa en manzana mexicana (*Malus domestica* Borkh)”, se presentan los resultados que demuestran la presencia de dicha proteína a lo largo del ciclo, en los cultivares “Golden Delicious”, “Red Chief

Delicious” y “Rome Beauty”; sin embargo, no hubo diferencias significativas en el contenido y actividad de la proteína inhibitoria de la proteínogalacturonasa, enzima responsable de la pérdida de firmeza en la manzana.

En el nogal pecanero se observa comúnmente la viviparidad, fenómeno fisiológico que causa pérdidas severas del fruto hasta de 40%, como lo señala el autor del artículo: “El ácido giberélico incrementa la germinación prematura en el nogal pecanero (*Carya illinoensis* Koch.)”. De acuerdo con el estudio, el incremento de la viviparidad mostró mayor asociación con la fecha de cosecha que con la dosis de ácido giberélico aplicado.

Los autores del artículo “Efectos por salinidad en el desarrollo vegetativo”, señalan que la productividad de los cultivos se ve limitada frecuentemente por el estrés salino, volviendo incluso improductivas aquellas tierras donde las altas concentraciones de sales impiden la germinación, reducen la tasa de crecimiento y dificultan el establecimiento del cultivo.

Ph. D. César H. Rivera Figueroa  
EDITOR EN JEFE

# Capacitación a estudiantes de ingeniería mecánica en mecanizado de alta velocidad

## Training for mechanical engineering students in high speed machining

RAÚL ARMANDO SALAS-MOTIS<sup>1,2</sup>, JOSÉ ESPARZA-ELIZALDE<sup>1</sup>  
Y ARTURO MORALES-BENAVIDES<sup>1</sup>

### Resumen

Se presenta una propuesta metodológica para capacitar a alumnos de la carrera de ingeniería mecánica en el mecanizado de alta velocidad para mejorar sus oportunidades de acceso al trabajo. La propuesta se basa principalmente en un análisis del mercado de trabajo, encuestas y entrevistas al personal de las empresas del sector del mecanizado, así como en los perfiles profesionales y necesidades formativas detectadas, además de documentación existente relativa a la industria del mecanizado. La investigación realizada en el año 2010 en el Instituto Tecnológico de Chihuahua (ITCH) sobre las necesidades y carencias formativas de estudiantes de ingeniería mecánica en el manejo adecuado del mecanizado por alta velocidad (MAV) arroja como principal resultado el que es indispensable el uso de un software CAM (manufactura asistida por computadora) para la generación adecuada de trayectorias de corte con el MAV.

**Palabras clave:** industria aeroespacial, manufactura asistida por computadora (CAM) MAV, maquinado de aluminio, planes educativos, velocidad de corte.

### Abstract

It is presented a methodological proposal to train students in mechanical engineering career in the high-speed machining to improve Access to employment opportunities. The proposal is based primarily on a labor market analysis, surveys and interviews to with staff of companies in the machining industry, professional profiles and training needs identified, in addition to existing literature on the machining industry. Research conducted in 2010 at the Instituto Tecnológico de Chihuahua (ITCH) On training needs and wants of students of mechanical engineering at the appropriate management of high-speed machining (HSM) yields the main result, which is indispensable to use a CAM software (computer aided manufacturing) to generate cutting paths appropriate to the MAV.

**Keywords:** aerospace industry, computer aided manufacturing (CAM), HSM, aluminum machining, educational plans, cutting speed.

### Introducción

Uno de los procesos de manufactura más usados en la producción de piezas metálicas es el corte con desprendimiento de material, conocido como mecanizado. En este proceso, una herramienta con filos cortantes penetra la superficie de una pieza desprendiendo el material en forma de viruta, hasta obtener el producto final. La demanda de componentes mecánicos de gran exactitud para sistemas de elevada precisión está aumentando considerablemente en los últimos años a nivel mundial. Este hecho ha provocado el desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas a los procesos de corte como la aplicación del corte a altas velocidades (Coronado-Marín, 2005).

<sup>1</sup> Instituto Tecnológico de Chihuahua. Ave. Tecnológico #2909, Col. 10 de Mayo. Chihuahua, Chih., México. 31310. Tel: (614) 201-2000.

<sup>2</sup> Dirección electrónica del autor de correspondencia: rasalas@itch.edu.mx

En términos generales, el mecanizado de alta velocidad se refiere al proceso de eliminación de material de una pieza mecánica por medio de desprendimiento de viruta a velocidades de corte muy superiores a los utilizados convencionalmente, es decir, mayores a las 20,000 revoluciones por minuto (Krar et al., 2009). El aumento de las velocidades de corte es una forma de incrementar la eficiencia de los procesos productivos a través de la reducción de los tiempos de fabricación (Martínez-Aneiro y Sánchez-Battaille, 2007).

El mecanizado de alta velocidad (MAV) ofrece gran cantidad de virtudes cortadas en la unidad de tiempo y, como consecuencia, importantes reducciones de tiempos de mecanizado. Lo anterior se traduce en menores tiempos de fabricación y reducción de costos de producción, sobre todo para aplicaciones en la industria aeroespacial (Kalpakjian y Schmid, 2008). El mecanizado por alta velocidad se ha convertido en un proceso importante en diversas aplicaciones, como el fresado de componentes grandes de aluminio para aeronaves, donde las máquinas deben tener alta rigidez y precisión, requiriendo por lo general de dispositivos de sujeción de alta calidad para mantener su confiabilidad (King, 1992).

Para ampliar el campo de colocación laboral del egresado de ingeniería mecánica es necesario incorporar mano de obra calificada para atender las necesidades de la industria metal-mecánica nacional. En este sentido, cada vez es más evidente la necesidad de contar con instituciones de nivel superior especializadas en formar el recurso humano competente.

Para desarrollar una propuesta de capacitación a estudiantes de ingeniería mecánica, se realizó un análisis del mercado de trabajo del ingeniero mecánico por medio de un estudio exhaustivo de las necesidades y carencias formativas en las áreas de desempeño profesional para el ingeniero mecánico en la ciudad de Chihuahua. En dicho estudio (obtenido por medio de entrevistas con personal de las empresas del sector del mecanizado, como gerentes de empresas) poco más del 80% de los entrevistados mencionan al manejo del MAV como una ineficiencia en el recién egresado de ingeniería mecánica.

Partiendo de que el mercado laboral demanda habilidades sobre el manejo del MAV acordes con los cambios tecnológicos que se están produciendo en esta industria, se trabaja sobre el objetivo específico de desarrollar una propuesta para capacitar a los alumnos de Ingeniería mecánica en mecanizado de alta velocidad, utilizando un sistema CAM en su capacitación, y así mejorar sus oportunidades de acceso al mercado laboral.

## Utilizaciones del MAV

Actualmente, las tecnologías de maquinado por arranque de material por viruta han ganado un gran interés e importancia desde la introducción del MAV (METALMECANICA, 2010), el cual permite obtener piezas con geometría compleja muy útiles en el sector del maquinado aeroespacial.

Entre los sectores industriales con amplia aplicación del MAV destaca principalmente el sector aeronáutico, debido sobre todo a que sigue siendo uno de sus objetivos el ahorro de combustible mediante la reducción de peso, sustituyendo el pesado acero empleado en los componentes estructurales de aviones, por aleaciones de aluminio con una excelente resistencia a la corrosión y con capacidad de mecanizado a alta velocidad (Ramírez-Medina, 2010).

Según la Dirección General de la Industria Aeroespacial de la Secretaría de Economía (SE) (2010), la perspectiva para las compañías del sector manufacturero es evolucionar de fabricación de partes de mediana complejidad, como se hace ahora, a manufacturas de bienes más complejos. Acorde con esta situación, la Federación Mexicana de la Industria Aeroespacial (FEMIA, 2009) en conjunto con el Consejo Mexicano de Educación Aeroespacial (COMEA, 2010) trabajan en el desarrollo de planes educativos para solventar la demanda que generará dicho sector, señalando que las compañías del sector requerirán personal calificado para operación de máquinas CNC, metrología dimensional, programación de rutas de corte en interfaces CAD/CAM, diseño de procesos y propuesta de nuevos diseños.

Según el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD, 2008), el futuro de

muchas armadoras es migrar a la producción de aeronaves para sustituir al automóvil en los próximos 25 años, adecuando sus prácticas para atender los requerimientos que establece la industria aeroespacial.

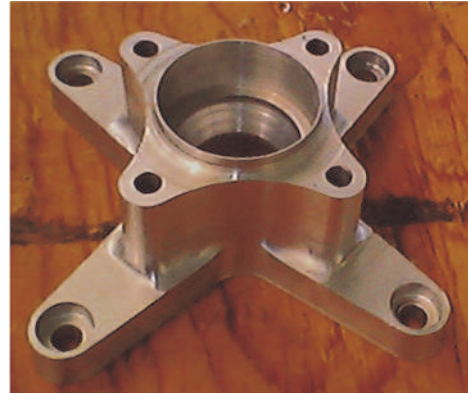
Según la FEMIA (2009), la industria de fabricación de aviones está cambiando sus planes y estrategias de producción para los próximos años, instalando sus nuevas plantas en territorio mexicano, lo que beneficiará a nuestro país, ya que se prevén alianzas y nuevas fuentes de empleo. Por ejemplo, según la Cámara Nacional de la Industria de Transformación (CANACINTRA, 2009), la industria aeroespacial en México crecerá de 100 fabricantes estadounidenses y europeos en el año 2004, a más de 350 para el año 2011.

Otro factor fundamental en la adopción del maquinado de alta velocidad ha sido el requisito para obtener una mejora adicional en las tolerancias dimensionales de las operaciones de corte, partiendo del hecho que al aumentar la velocidad de corte, la viruta elimina cada vez más el calor generado, por lo que la pieza de trabajo mantiene una temperatura cercana a la del medio ambiente. Esto resulta benéfico, porque no existe dilatación térmica de la pieza durante el maquinado (Rao, 2000). El MAV tiende a sustituir las pasadas de gran profundidad a baja velocidad de corte por muchas pasadas rápidas de menor profundidad de corte, obteniendo un considerable aumento de viruta desalojada (volumen de material por unidad de tiempo). Por ejemplo, no es lo mismo maquinar componentes y partes de tecnología estándar de mediana complejidad para la industria automotriz (Figura 1), que partes de vanguardia para la industria aeroespacial, pues esta última emplea la manufactura de alta velocidad, donde la rigidez mejorada de los centros de mecanizado actuales permite que la máquina corte más rápido y a mayor profundidad, logrando así una tasa más alta de remoción de metal.

Otro ejemplo es la aplicación del MAV en la fabricación de estructuras aeronáuticas (Figura 2), donde la tendencia es cada vez más hacia el diseño de componentes monolíticos, reduciendo al máximo el número de partes ensambladas, disminuyendo el peso y obteniendo un comportamiento mecánico más

homogéneo. En este tipo de piezas se elimina hasta un 95% del peso del bloque inicial en un tiempo mínimo.

**Figura 1.** Componente de mediana complejidad para la industria automotriz.



**Figura 2.** Moldura típica compuesta de paredes y suelos delgados.



Hasta hace poco, muchas de estas piezas eran producidas basándose en técnicas de prueba y error, actualmente con el correcto manejo del MAV y estrategias de maquinado simuladas por medio de computadora, las piezas son obtenidas en tiempos récord a costos mínimos (Groover, 1997).

De acuerdo con la recopilación y análisis estadístico de la información de entrevistas personales al personal de las empresas del sector del mecanizado, se propone la siguiente estrategia a seguir para capacitar al alumno de ingeniería mecánica en el mecanizado de alta velocidad:

Realizar prácticas: este recurso fue el más señalado por los encuestados en cuanto a su importancia para los logros de los objetivos del



aprendizaje. Es entonces muy importante su implementación buscando aprender mejor los conceptos; así, cuando el estudiante realiza los ejercicios deberá mecanizar las piezas en un simulador, para verificar la secuencia de programación y finalmente proceder al mecanizado de la pieza en una máquina real.

Según el Instituto de Máquina Herramienta (IMH, 2008), para un buen enlace entre la teoría y la práctica del maquinado se propone realizar actividades prácticas en distintos entornos (como laboratorios o talleres de la institución o en la planta industrial), en función de los acuerdos que la institución consiga con el medio productivo, logrando así un acercamiento de los estudiantes a situaciones reales de trabajo.

Otro recurso muy valioso, detectado principalmente en las entrevistas, fue la técnica grupal o aprendizaje colaborativo, que favorece la comunicación e intercambio de información entre los diversos alumnos que llevan el curso (ITCH, 2011).

Se distingue que el principal problema que acompaña a la implantación de la alta velocidad en aplicaciones prácticas es la "falta de un método adecuado". Para resolverlo, se trabaja en la definición de esta metodología para después pasar a fase de pruebas.

Las características generales de la propuesta metodológica de capacitación en MAV a seguir son las siguientes:

- *Formación presencial.* La opinión predominante es que este entrenamiento se debe impartir de manera presencial. Esta podría complementarse con adiestramiento a distancia, que permitiese una mayor libertad de horario a los receptores de la misma.

- *Duración moderada.* La duración preferida para los cursos se sitúa entre 10 y 40 horas. Parece que los cursos de menos de 10 horas se consideran insuficientes.

- *Combinación de teoría y práctica.* La gran mayoría se inclina por una combinación de formación teórica y práctica más o menos nivelada. En caso de predominio de uno de los dos tipos de contenidos se prefiere un predominio de la práctica, esta última,

con supervisión docente. Con este balance entre la teoría y la práctica se pretende desarrollar capacidades en el egresado que activen nuevos conocimientos, destrezas y habilidades para que el alumno las ponga de manifiesto en su vida laboral productiva.

- *La formación práctica se aconseja fuera del horario de clases.* Generalmente, se considera que sería mejor recibir ésta, o al menos una parte, fuera de las horas de clases debido a la variación de la duración de la experimentación requerida.

## Conclusiones

Mediante el estudio en cuestión se concluye que es necesario el manejo de un sistema CAM (Manufacturing Aided Computer) con agilidad, disponer de conocimiento de las herramientas empleadas en este mecanizado, desarrollar las estrategias de mecanizado por alta velocidad y retroalimentarlas con los alumnos.

Dentro de los contenidos curriculares debemos garantizar el uso de herramientas informáticas para el diseño, el cálculo y la elaboración de proyectos. Así mismo, la formación de profesionistas debe concentrarse en la aplicación de procesos de manufactura, seguridad de ensamblado e ingeniería de diseño.

En el I.T.Ch, se trabaja en la fase de pruebas con la generación y difusión de documentación técnica sobre esta metodología con alumnos de últimos semestres que hayan cursado las materias de "Procesos de fabricación" y "Manufactura", y con alumnos que se encuentran elaborando sus tesis con temas afines, para obtener su título de ingeniero mecánico. Se espera acrecentar y perfeccionar la forma de trabajar con el MAV para ofrecer egresados altamente capacitados y actualizados.

## Literatura citada

- CANACINTRA, 2009. Cámara Nacional de la Industria de Transformación. [http://canacintrachihuahua.org.mx/images/revistas/revista\\_transforma42.pdf](http://canacintrachihuahua.org.mx/images/revistas/revista_transforma42.pdf) p36-37
- COMEIA, 2010. Consejo Mexicano de Educación Aeroespacial. <http://www.e-itesca.edu.mx/comeia/>
- Coronado-Marin, John Jairo, 2005. Economía en el maquinado para la industria metalmecánica. Universidad ICESI. Cali, Colombia, p39-46

- FEMIA, 2009. Federación Mexicana de la Industria Aeroespacial, <http://femia.com.mx/>
- Groover, Mikell P., 1997. Fundamentos de Manufactura Moderna. Prentice-Hall Hispanoamericana, México p596-645.
- ITCH, 2011. Instituto Tecnológico de Chihuahua, <http://www.itch.edu.mx/academic/desacad/ofertaeducativa/mecanica.html>
- IMH, 2008. Instituto de Máquina Herramienta. <http://www.imh.es/>
- Kalpakjian, Serop y Schmid, S.R. 2008. Manufactura, Ingeniería y Tecnología, 5a. Edición. Pearson, México p778-787
- King, Frank, 1992. El aluminio y sus aleaciones. Limusa, Grupo Noriega editores México p248-250
- Krar, Steve F., Arthur R. Gill y Peter Smid, 2009. Tecnología de las Máquinas Herramienta, 6a. Edición. Alfaomega, México p.467-472, 642-668
- Martínez-Aneiro, F. y T. Sánchez-Battaille, 2007. Conceptos del maquinado con altas velocidades de corte en moldes y matrices. Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría, Cuba, p63-69. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=225117649009>
- METALMECANICA, 2010. Revista "METALMECANICA" Edición 4 - Vol. 15, <http://www.metalmecanica.com/>
- PNUD, 2008. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, <http://www.undp.org.mx/>
- Ramírez - Medina, Leidy Janeth, 2010. Tesis Doctoral: Fatiga de aleaciones de aluminio Aeronáutico con nuevos tipos de anodizado de bajo impacto ambiental y varios espesores de recubrimiento. Dirigida por Dra. Mar Toledano Prados, UNIVERSIDADE DA CORUÑA, Junio, 2010. [http://ruc.udc.es/dspace/bitstream/2183/7323/2/RamirezMedina\\_LeidyJaneth\\_TD.pdf](http://ruc.udc.es/dspace/bitstream/2183/7323/2/RamirezMedina_LeidyJaneth_TD.pdf)
- Rao, P. N., 2000. Manufacturing Technology. Tata McGraw-Hill, New Delhi, p376-411
- SE, 2010. Secretaría de Economía, <http://www.economia.gob.mx>

---

Este artículo es citado así:

Salas-Motis, R. A., J. Esparza-Elizalde y A. Morales-Benavides. 2011: *Capacitación a estudiantes de ingeniería mecánica en mecanizado de alta velocidad*. *TECNOCENCIA Chihuahua* 5(3): 116-120.

## Resúmenes curriculares de autor y coautores

**RAÚL ARMANDO SALAS-MOTIS.** Terminó sus estudios de ingeniería en 1992, obteniendo el título de Ingeniero Mecánico Industrial en el Instituto Tecnológico de Chihuahua (ITCH). Realizó su posgrado en el Instituto Tecnológico de Monterrey (ITESM), donde obtuvo el grado de Maestro en Ingeniería en Sistemas de Calidad y Productividad en 2005. Actualmente se desempeña como Jefe de Laboratorio de Manufactura y como docente en la cátedra de Manufactura Asistida por Computadora en el ITCH. Su área de especialidad es el maquinado por control numérico de aluminio en centros de maquinado con tres ejes simultáneos.

**JOSÉ ESPARZA-ELIZALDE.** Terminó sus estudios de ingeniería en 1981, obteniendo el título de Ingeniero Industrial Mecánico en el Instituto Tecnológico de Chihuahua (ITCH). Actualmente se desempeña como docente en las cátedras de Procesos de Fabricación en el ITCH. Su área de especialidad son los procesos de conformado de metales.

**ARTURO MORALES-BENAVIDES.** Terminó sus estudios de ingeniería en 1989, obteniendo el título de Ingeniero Industrial Mecánico en el Instituto Tecnológico de Chihuahua (ITCH). Realizó su posgrado en la Universidad Autónoma de Chihuahua, donde obtuvo el grado de Maestro en Administración en 2001. Actualmente se desempeña como Jefe de Depto. METAL-MECANICA y como docente en la cátedra de Circuitos Hidráulicos y Neumáticos en el ITCH. Sus áreas de especialidad son Planeación Estratégica, Sistemas Hidráulicos y Automatización.

# Cypermethrin, deltamethrin and glyphosate affect the activity of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase from human erythrocyte

## Cipermetrina, deltametrina y glifosato afectan la actividad enzimática de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de eritrocito humano

JAVIER VARGAS-MEDRANO<sup>1</sup>, JORGE A. SIERRA-FONSECA<sup>2</sup>, MANUEL ARELLANO-CARRILLO<sup>3</sup>  
AND FERNANDO PLENGE-TELLECHEA<sup>3,4</sup>

Recibido: Mayo 3, 2011

Aceptado: Julio 7, 2011

### Abstract

The extensive use of pesticides can cause many human health problems. However, the effects of pesticides on a biochemical level are still poorly understood. In this study we analyzed the effect of different pesticides on the plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA) and on the sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) activities. Different amounts of pesticides were added to the Ca<sup>2+</sup>-dependent ATPase assays in order to determine if they were affecting the ATPase activity. The results showed that PMCA activity was partially inhibited by deltamethrin to 51.85% ± 3.7 when its concentration in the reaction medium was 0.5 mM, while cypermethrin and glyphosate stimulated the PMCA activity at the lowest concentrations tested. The maximum stimulatory effect of cypermethrin was of 155% ± 9.0 at a concentration of 0.2 mM. In addition, the herbicide glyphosate stimulated the activity 111% ± 2.0 at a concentration of 0.2 mM. In conclusion, our results showed that PMCA activity was partially inhibited by deltamethrin, but cypermethrin and glyphosate stimulated their activity. Our findings suggest that cypermethrin and deltamethrin have different structure-activity relationships. However, SERCA was not sensitive to deltamethrin or glyphosate. These differences may be reflected in disturbs over cellular calcium regulation.

**Keywords:** PMCA (plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase), SERCA (sarco/endoplasmic Ca<sup>2+</sup>-ATPase) enzymatic activity, cypermethrin, deltamethrin, glyphosate.

### Resumen

Se ha observado que la exposición de personas a plaguicidas puede causar problemas a la salud. Sin embargo, el estudio del efecto de plaguicidas a un nivel bioquímico ha sido pobremente estudiado. En este estudio, analizamos el efecto de cipermetrina, deltametrina y glifosato sobre la actividad enzimática de las Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de membrana plasmática (PMCA) y de retículo sarcoplásmico (SERCA). Diferentes concentraciones de estos pesticidas fueron añadidas a los experimentos de actividad enzimática como estrategia para determinar si estos compuestos eran capaces de afectar la actividad enzimática de PMCA. Nuestros resultados demuestran que la actividad enzimática de PMCA fue parcialmente inhibida por deltametrina en un 51.85% ± 3.7 cuando su concentración fue de 0.5 mM, mientras que cipermetrina y glifosato estimularon la actividad enzimática de PMCA a menores concentraciones. El máximo efecto estimulador de cipermetrina fue de 155% ± 9.0 cuando el compuesto alcanzó una concentración de 0.2 mM. Además, el herbicida glifosato fue capaz de estimular la actividad enzimática de PMCA en un 111% ± 2.0 a concentraciones de 0.1-0.2 mM. En conclusión, nuestros resultados demostraron que la actividad enzimática de PMCA fue también parcialmente inhibida con deltametrina, pero al contrario de cipermetrina y glifosato la estimularon. Nuestros resultados sugieren que las diferencias en las estructuras químicas de cipermetrina y deltametrina se ven reflejadas en el efecto provocado sobre PMCA. Sin embargo, una enzima similar, SERCA, no fue afectada ni por deltametrina ni glifosato. Estas diferencias se pudieran ver reflejadas en disturbios sobre la regulación celular del calcio.

**Palabras clave:** PMCA (ATPasa de Ca<sup>2+</sup> de membrana plasmática), SERCA (ATPasa de Ca<sup>2+</sup> de retículo endo/sarcoplásmico), actividad enzimática, cipermetrina, deltametrina, glifosato.

<sup>1</sup> Center of Excellence for Infectious Diseases, Biomedical Sciences Department, Texas Tech University Health Science Center and Paul L. Foster School of Medicine. El Paso, TX, U.S.A. 79905

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences, University of Texas at El Paso, El Paso, TX, U.S.A. 79968

<sup>3</sup> Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Juárez, Chih. México. Anillo Envoltante del Pronaf y Estocolmo s/n. Ciudad Juárez, Chih., México. C. P. 32300. Tel/Fax: 656 688 1800 al 09

<sup>4</sup> Dirección electrónica del autor de correspondencia: fplenge@uacj.mx.

## Introduction

Pesticides are chemicals used worldwide in agriculture and in household settings, resulting in continuous human exposure from different sources including food, water, and occupational exposure. The effect of pesticides is targeted to specific organisms, however, pesticides are toxic substances widely released into the environment, thus posing a threat to human health (Alavanja *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2004). The damage caused by pesticide exposure has been a matter of concern for many years, but the toxic effects induced by most of these chemical compounds remain enigmatic (Alavanja *et al.*, 2004).

Pyrethroids are among the most used pesticides, and unlike first generation pyrethroids, the second generation of pyrethroids are more resistant to the environmental conditions and therefore are more persistent and toxic to living organisms. Two members of the second generation group are cypermethrin and deltamethrin, and they were studied in the present work. The toxic action of pyrethroids mainly focuses on the nervous system by interfering with the ionic channels, which causes membrane depolarization, synaptic alterations and immunotoxicity (Madsen *et al.*, 1996; Narahashik, 1996; Soderlund *et al.*, 2002; Diel *et al.*, 2003). Glyphosate, a frequently used organophosphate herbicide, has been reported to cause toxic effects such as nausea, renal failure, hepatic alterations, and behavioral disturbances and also affect the animal cell cycle (Steinrucken *et al.*, 1980; Marc *et al.*, 2002; De Roos *et al.*, 2005). Calcium (Ca<sup>2+</sup>) signaling is a key parameter for cell survival. Calcium acts as a carrier of signals for different cellular processes, including muscle contraction, synaptic transmission and apoptosis. This means that intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration must be strictly regulated (Carafoli, 2002). The plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA) plays a key role in the maintenance of Ca<sup>2+</sup> homeostasis. PMCA is a membrane-bound enzyme responsible for Ca<sup>2+</sup> transport from the cytosol to the extracellular space using the energy provided by the ATP hydrolysis. Typically the erythrocyte is the selected cell to obtain PMCA preparations, but the enzyme is present in all eukaryotic plasma membranes. The hydrolytic activity of PMCA can be directly

stimulated by calmodulin (CaM), a small cytosolic Ca<sup>2+</sup>-binding protein (Carafoli, 1992). Another enzyme responsible for the maintenance of low Ca<sup>2+</sup> concentration in the cytoplasm is the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA). This enzyme translocates Ca<sup>2+</sup> from the cytosol to the lumen of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum in an ATP-dependent mechanism (Khan *et al.*, 2000).

The toxic mechanisms of pesticides should be different for each case. However, since these molecules are generally lipophilic, the phospholipid bilayer of biological membranes could be a suitable toxicity target (Chefurka *et al.*, 1987). This could interfere with membrane function and fluidity, thus affecting membrane-associated enzymes such as PMCA and SERCA. For instance, parathion, an organophosphate pesticide, is known to alter membrane organization, and it also has been shown that hexachlorobenzene, a cyclic organochlorine and hydrophobic pesticide, affects the functionality of two membrane-bound enzymes: 5'-nucleotidase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Courtney, 1976; Antunes-Madeira *et al.*, 1994; Randi *et al.*, 1998). Damage to the erythrocyte and sarcoplasmic reticulum (SR) membranes by some pesticides has been previously reported (Duchnowicz and Koter, 2003; Bhalla and Agrawal, 1998; Sahib and Desai, 1987). In addition, the functionality of PMCA and SERCA can be affected by a variety of hydrophobic molecules, including some studied pesticides (Price, 1976; Jones *et al.*, 1985; Michelangeli *et al.*, 1990; Janik and Wolf, 1992; Salas and Romero, 1996; Plenge-Tellechea *et al.*, 1999). The aim of the present study was to test if

cypermethrin, glyphosate and deltamethrin were able to affect the Ca<sup>2+</sup>-ATPase hydrolytic activity of PMCA; specifically the human PMCA found in membranes from erythrocyte. Findings from this investigation will shed light on the possible toxicological damage induced by these widely used pesticides to this human Ca<sup>2+</sup>-ATPase.

## Material and methods

**Biological materials.** Plasma membrane-containing PMCA (EC=3.6.3.8) were obtained from packed human erythrocytes of non-outdated human blood. Packed human blood was a donation from the General Hospital in the city of Juárez, México. For the isolation of SR vesicles enriched with SERCA (EC=3.6.3.8), female New Zealand rabbit weighing 2 kg were obtained from the biotherium and sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber. All the biological materials used were obtained in accordance with the moral and ethical principles of the University Autonomous of Juárez City (UACJ).

**Chemicals.** Adenosine 5' triphosphate (ATP) and bovine serum albumin were purchased from Sigma Inc. (Mexico). CaCl<sub>2</sub> was obtained from J. T. Baker (Mexico). Cypermethrin (alpha-methrine) (CAS: 52315-07-8), deltamethrin (CAS: 52918-63-5) and glyphosate (glyphosate-ammonium) (CAS: 1071-83-6) were acquired from Supelco (USA). The Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187 (calcimycin), EGTA (ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid), Mops were purchased from Sigma-Aldrich Co. (Mexico). Other chemicals used in this investigation were reagent grade. Cypermethrin and deltamethrin were dissolved in methanol. The concentration of methanol added in the experiments never was higher than 1% (v/v). Glyphosate was dissolved in warm water.

**Isolation of erythrocyte membranes containing PMCA.** Hemoglobin-free erythrocyte membranes depleted of endogenous CaM were obtained from non-outdated packed human erythrocytes according to a previously described method (Niggli *et al.*, 1979), except for the use of 10 mM Mops-K<sup>+</sup> (Mops: 4-morpholine-

propane-sulfonic acid), pH 7.4 in the last four washes to remove EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid). The erythrocyte membrane preparations were stored in aliquots at -80°C until they were used.

**Preparation of SR vesicles enriched with SERCA.** Microsomal membranes were obtained by differential centrifugation after homogenization of low density SR of skeletal fast-twitch muscles. They were preserved in 10 mM Mops pH 7.0 and 30% (w/v) sucrose as previously described (Eletr and Inesi, 1972), and stored at -80°C until they were used.

**Protein concentration.** The total membrane protein concentration was determined by the colorimetric method described by Lowry *et al.* (1951), using bovine serum albumin as the standard protein.

**Free Ca<sup>2+</sup> concentration in the reaction medium.** The free Ca<sup>2+</sup> concentration used in the experiments was determined using a computer program (Fabiato and Fabiato, 1979). The computer program *Calcium* takes into account the absolute stability of the constant value for the Ca<sup>2+</sup>-EGTA complex, the EGTA protonation equilibria (Blinks *et al.*, 1982), the presence of Ca<sup>2+</sup> ligands, and the pH in the medium.

**PMCA activity.** The PMCA activity was performed at 37°C in a typical reaction medium containing 30 mM Mops buffer pH 7.0, 130 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> (10 μM free Ca<sup>2+</sup>) and 0.12 mg protein/ml. The reaction was started with the addition of 1 mM of ATP. The PMCA activity was determined using the colorimetric method described by Lanzetta *et al.* (1979), following the appearance of P<sub>i</sub> (inorganic phosphate) during the ATP hydrolysis reaction. The stabilizing agent Sterox was substituted by 0.18% (v/v) of Tween-20 as described by Baykov *et al.* (1988). Different concentrations of the pesticides cypermethrin, deltamethrin, and glyphosate were also present in the mixture as indicated in the corresponding figure. The enzymatic activity was measured in the absence of CaM.

**SERCA activity.** The hydrolytic reaction was measured at 25°C by determining the appearance of P<sub>i</sub> using a previously described colorimetric method by Lin and Morales (1977). The reaction mixture contained 20 mM Mops buffer pH 7.0, 80 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 0.967 mM CaCl<sub>2</sub>, (10 μM free Ca<sup>2+</sup>), and 0.75 μM A23187. The enzymatic reaction started by the addition of 1 mM ATP. Different concentrations of the pesticides deltamethrin and glyphosate were also present in the mixture as indicated in the corresponding figure.

**Statistical analysis and other specifications.** Statistical analysis such as Pearson product moment correlation, linear regression and standard error were calculated with the computer software Sigma Plot Graph System. Pesticides were always included in the incubation/reaction medium after erythrocyte membranes or SR vesicles had been added. The mixtures were always pre-incubated for at least 2 minutes before the reactions were started. The experimental data corresponds at least to three independent measurements performed in duplicates and using more than one membrane preparation.

## Results

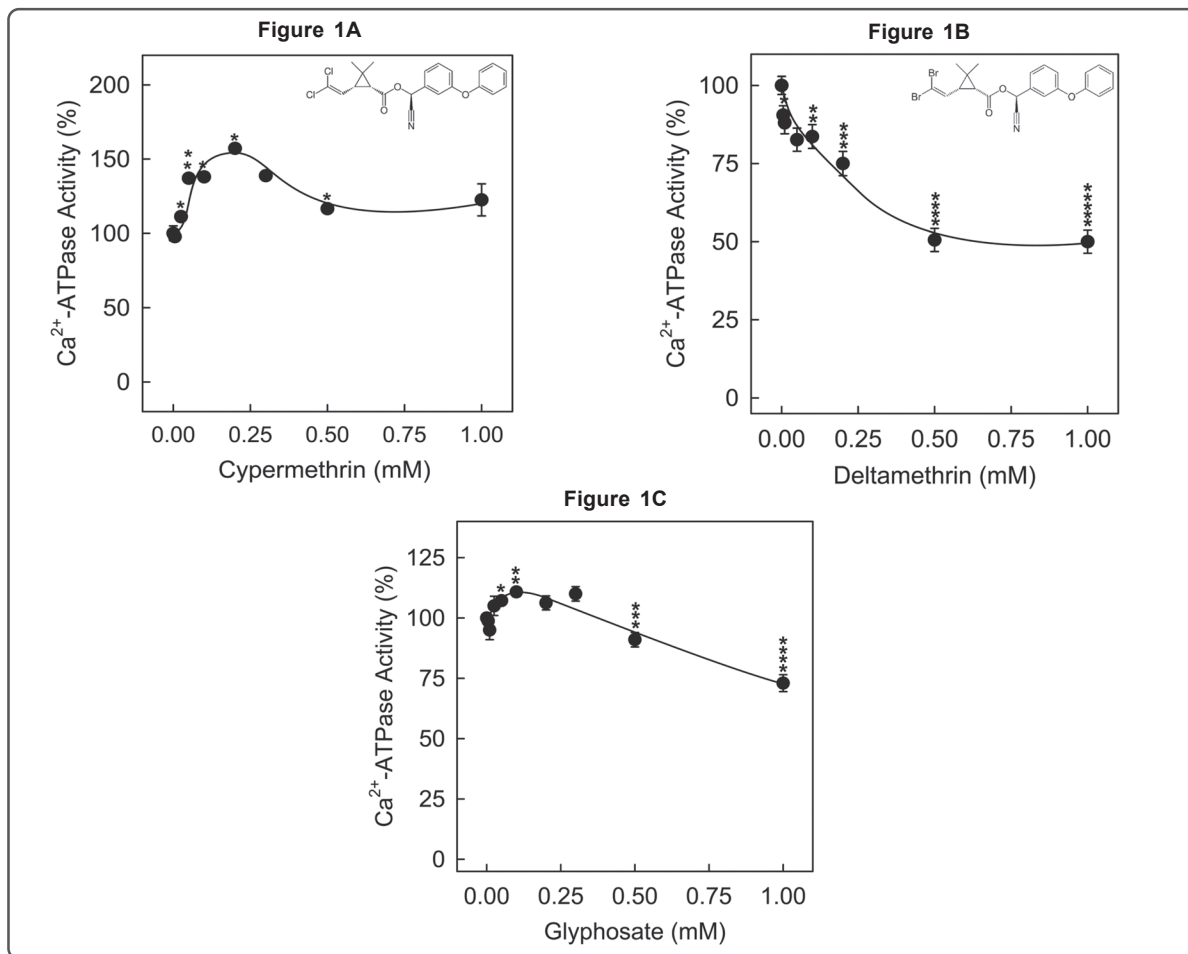
**Cypermethrin, deltamethrin and glyphosate affect PMCA activity in different manners.** The present study shows the effect of cypermethrin, deltamethrin and glyphosate on the specific ATP hydrolysis mediated by PMCA. This Ca<sup>2+</sup>-dependent pump utilizes ATP as a source of energy to pump Ca<sup>2+</sup> across the plasmatic membrane. Our study consisted of different independent treatments in which distinct concentrations of pesticides were added to the PMCA reaction medium. Randomly, different concentrations of cypermethrin, deltamethrin and glyphosate were tested in order to determine which ones affected the Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity (PMCA). Therefore, only the concentrations that produced an effect are shown in this study. This biological system is measured by following the appearance of phosphate during the ATP hydrolysis and it was followed using a

spectrophotometric procedure (Lanzetta *et al.*, 1979; Baykov *et al.*, 1988). The pesticides tested on PMCA activity were cypermethrin, glyphosate and deltamethrin using the appropriate concentrations of K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, ATP, and Ca<sup>2+</sup>. This study was conducted in the absence of CaM. The second generation pyrethroids cypermethrin and deltamethrin altered the PMCA activity as shown in Fig. 1. Cypermethrin significantly stimulated the ATP hydrolysis at concentrations from 0.005-0.5 mM without inhibiting the Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity (Fig. 1A).

The maximal stimulation was 55% ± 9.0 over the activity control, at a concentration of 0.2 mM. However, deltamethrin did not stimulate PMCA activity. Interestingly, deltamethrin significantly inhibited the hydrolytic activity of the enzyme to 51.85% ± 3.7 at 0.5 mM (Fig. 1B). In addition, we studied the effect of glyphosate and unexpectedly this pesticide affected PMCA activity in a biphasic manner. As well as cypermethrin, glyphosate significantly stimulated the hydrolytic activity of the enzyme over 11% ± 2.0 with respect the control when its concentration was between 0.05-0.10 mM (Fig. 1C). However, higher concentrations of glyphosate (0.5-1.0 mM) significantly inhibited PMCA activity to 73% ± 3.5 when compared to the control. Our findings prove that cypermethrin and deltamethrin, two second generation pyrethroids, affected PMCA activity, as well as glyphosate.

**The Ca<sup>2+</sup>-ATPase SERCA was unaffected by deltamethrin and glyphosate.** In order to investigate if our previous findings were general effects for other Ca<sup>2+</sup>-ATPases, we studied the SERCA activity as a function of the pesticide concentration (deltamethrin and glyphosate). We choose only one compound from the second generation of pyrethroids, and the organophosphate glyphosate to test our hypothesis. The concentrations of deltamethrin and glyphosate used in this study were in the same ranges as previously used for PMCA. The Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity was measured at 25°C, in a buffered medium containing 10 μM free Ca<sup>2+</sup> and 1 mM ATP. This is a reliable and well established procedure of measuring SERCA activity.

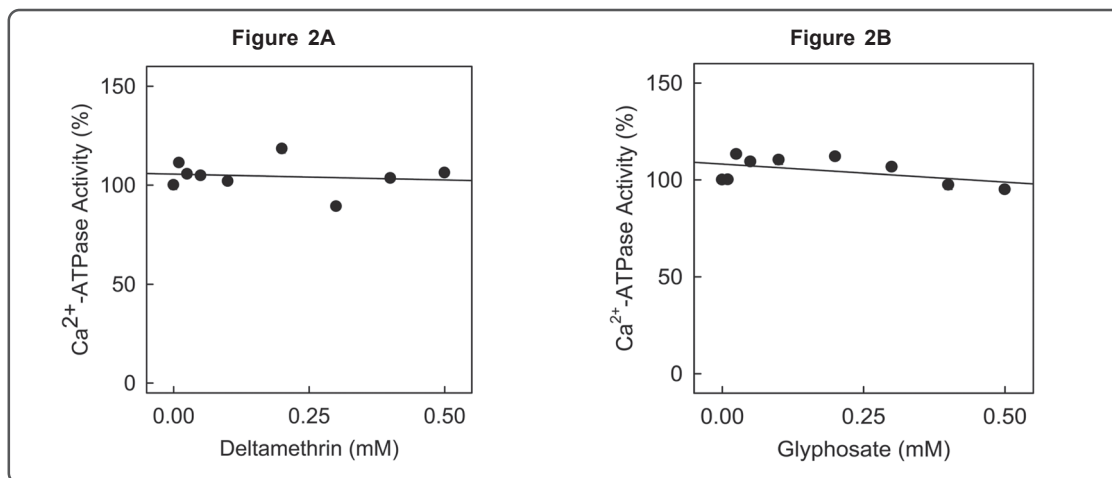
**Fig 1. The effect of cypermethrin, deltamethrin and glyphosate on the hydrolysis of ATP mediated by the Ca<sup>2+</sup>-ATPase from human plasma membrane.** The reactions were performed as described in *Methods* and they were started after the addition of 1 mM ATP. The ATPase activity was measured in the steady state of the enzyme. Different concentrations of pesticides were added into reaction media as indicated at the x axes. Closed circles show the average of 3 ± SE independent experiments. For figure A) \*,  $p < 0.001$ , \*\*,  $p = 0.002$ ; for figure B) \*,  $p = 0.020$ , \*\*,  $p = 0.003$ , \*\*\*,  $p = 0.010$ , \*\*\*\*,  $p < 0.001$ , \*\*\*\*\*,  $p = 0.002$ ; for figure C) \*,  $p < 0.001$ , \*\*,  $p = 0.006$ , \*\*\*,  $p = 0.012$ , \*\*\*\*,  $p = 0.005$  compared to the control that correspond to the 100% of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. The average ( $n=3$ ) of ATPase activity control was 18nmol P/min/mg of protein and it was normalized to 100%. The chemical structures of cypermethrin and deltamethrin are shown and they differ in substitution of two bromines in deltamethrin for two chlorines in cypermethrin (PubChem Substance ID: 24868901 and 40585 respectively).



This data was obtained in the presence of a membrane protein concentration of 0.01 mg SR protein/ml. Deltamethrin (Fig. 2A) was not found to significantly affect SERCA activity, as demonstrated by a Pearson product-moment correlation coefficient -0.135 with a  $p=0.7283$  ( $n=9$ ), indicating the lack of a statistically significant relationship between enzyme activity and deltamethrin concentration. Similar results were obtained when we assayed glyphosate (Fig. 2B); since the compound was not found to significantly affect SERCA activity. This was confirmed with a correlation test, which provided

a correlation coefficient of -0.502 with a  $p=0.168$  ( $n=9$ ), once again indicating that there was not a statistically significant relationship between SERCA activity and glyphosate concentration. This conclusion was determined based on the high  $p$ -values ( $p \geq 0.05$ ) obtained for each corresponding analysis. Therefore, the pesticides tested on the SERCA activity (glyphosate and deltamethrin) had no significant effect on the ATP hydrolytic activity mediated by this SERCA at the tested concentrations. In conclusion, our results show that SERCA is not sensitive to glyphosate and deltamethrin.

**Fig 2.** The effect of deltamethrin and glyphosate on the hydrolysis of ATP mediated by the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity was measured as described in *Methods* and 1 mM ATP was used to start the reaction in the steady state of the enzyme. The pesticides were titrated as indicated at the x axes. Each data point is the average of 3 ± SE independent experiments. Lines correspond to a computed linear regression showing no significant effect ( $p \geq 0.05$ ) of cypermethrin and deltamethrin on the SERCA activity. The ATPase activity was  $2.713 \pm 0.008 \mu\text{mol P}_i/\text{min}/\text{mg}$  of SR and it was normalized to 100%.



## Discussion

Our research was conducted to study the effect of cypermethrin, deltamethrin and glyphosate on the hydrolytic activity of the human PMCA, which is found in membranes from erythrocytes.

Pyrethroids, like cypermethrin and deltamethrin, are widely used in combination with organophosphates instead of chlorinated-hydrocarbons such as DDT. In addition, it was established that pyrethroids were designed to target sodium channels (Cremer, 1983; Narahashi, 1996). Later on, pyrethroids were improved into more environmental resistant compounds and they were called pyrethroids of second generation and good examples of these are cypermethrin and deltamethrin. The second generation of pyrethroids, cypermethrin and deltamethrin were both dissolved in methanol; however, the amount of methanol added together with the pyrethroids into the reaction media never exceeded 1% as a final concentration. The main reason for maintaining a low concentration (lower than 1%) of methanol in our assays was to avoid significant effects on PMCA or SERCA activities. Alcohols such

as methanol are known to stimulate Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity and this was carefully evaluated in our lab before titrating pyrethroids into our assays (Benaim *et al.*, 1994). The studies in the effect of cypermethrin, deltamethrin and glyphosate on Ca<sup>2+</sup>-ATPases have been described few times in the literature, in different animal and plant models, but not in particular on the human PMCA isoform from membranes of erythrocyte, therefore, the importance of our study (Clark *et al.*, 1987; Sahib *et al.*, 1987; Kodavanti *et al.*, 1993; Souza da Silva *et al.*, 2003). To the best of our knowledge, the effect of these compounds have never been reported before for human PMCA from membranes of erythrocyte. Similar studies were done, such as the study of esbiol and cyfluthrin effect on Ca<sup>2+</sup>-ATPase using rat's leukocyte and synaptosome membranes (Grosmal and Diel, 2005). According to our data, the pyrethroid cypermethrin produced a marked increase on the PMCA enzymatic activity, followed by a partial inhibition on the PMCA activity (Fig. 1A). While the hydrolytic activity was inhibited when deltamethrin was titrated into the PMCA reaction



(Fig. 1B), on the other hand, glyphosate exhibited the same biphasic effect that we observed with cypermethrin, but the stimulation and inhibition was lower (Fig. 3C). The adverse effect produced by these pesticides is related to the chemical structure of each compound (Soderlund *et al.*, 2002). Even though the pyrethroid molecules under study have similar structures, they do not affect different enzymes in the same way, hence the importance of studying each individual compound on specific enzymatic systems. Many structure-activity relationship studies have been reported and it has been shown that minor changes in the chemical structure of a compound can dramatically modify the effect of the molecule on different protein systems (Plenge-Tellechea *et al.*, 1999). Structurally, both pyrethroids share a similar structure with a minor difference. Cypermethrin is a chlorinated compound, with two chlorides in their structure, in contrast to deltamethrin that contains two bromines instead of chlorides (Inserts in Fig. 1A and 1B respectively). These small modifications in the chemical structure of both cypermethrin and deltamethrin produced a different structure-activity relationship. While the chlorines in cypermethrin are making it a stimulator of PMCA activity at the lower concentrations tested and then an inhibitor at higher concentrations, the bromide-bearing deltamethrin acts as a PMCA inhibitor only.

Different authors mentioned that pyrethroids are highly hydrophobic pesticides with a high-tendency to target biological membranes from which they can disrupt membrane organization, thus affecting the activity of membrane proteins. In addition to our findings, pyrethroids are known to inhibit the ATPase activity derived from rat, squid, toad, and cockroach brain membrane preparations (Michelangeli *et al.*, 1990; Berlin *et al.*, 1984; Clark and Matsumura, 1987; Sahib *et al.*, 1987; Moya-Quiles *et al.*, 1996). Additionally, the pyrethroids cypermethrin and permethrin are known to inhibit the activity of the synaptosomal

ATPase from rat brain, while permethrin, esbiol, and cyfluthrin affect the activity of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase from leukocyte membranes (Kakko *et al.*, 2003; Grosman and Diel, 2005). This is an important issue, because even though ATPases can be similar or the same in different cell types, the lipidic composition of a membrane may change the effect of a compound in a given ATPase. Membrane lipid composition has been shown to be determinant in the effect of compounds like pyrethroids. Comparative studies using Ca<sup>2+</sup>-ATPase in different rat membrane had been shown to differ in sensibility to pyrethroids (Grosman and Diel, 2005). Therefore, it is very interesting to see how the effect of the same compound varies in ATPases from different derived preparations or cell source.

Glyphosate is a pesticide that belongs to the group of widely used organophosphates. They produce alterations on ATPases and good examples of them are anilofos and paraoxon (Blasiak, 1995; Hazarika *et al.*, 2001). In addition, there is evidence suggesting that malathion inhibits ATP hydrolysis in brain membranes preparations from zebrafish (Senger *et al.*, 2005). In agreement with our results, where glyphosate inhibited PMCA hydrolytic activity (Fig. 1C), it has been shown that glyphosate inhibits the ATPase of slug nervous system (Souza da Silva *et al.*, 2003). It was interesting to find out, that glyphosate affected PMCA activity as well as the herbicide paraquat, which is known to inhibit PMCA activity in membranes from erythrocyte (Janik and Wolf, 1992). However in neurons, paraquat induced the production of ROS and this seems to inactivate neuronal PMCA (Zaidi *et al.*, 2009).

Unlike PMCA, SERCA was more resistant to the adverse effects of the selected pesticides in our experiments. None of the pesticides tested (glyphosate and deltamethrin) had a significant effect on the hydrolytic activity of the SERCA, based on the high *p*-values obtained ( $p \geq 0.05$ ) (Fig. 2A and 2B). We performed these experiments in SERCA in order to validate our findings in PMCA, and surprisingly they were

very different. This difference may be due to the closed-membranes (spherical shape) of SR vesicles and to the great quantity of Ca<sup>2+</sup> pumps per total protein, which represents 0.2 μM of Ca<sup>2+</sup>-ATPase per 0.05 mg/ml of total membrane protein (Deamer and Baskin, 1969; Lax *et al.*, 2002). In contrast with SERCA, PMCA is an open-membranes system. Plasmatic membrane from erythrocytes also contained less Ca<sup>2+</sup>-ATPase in compared to SR vesicles, as the quantity of functional membrane protein represents only 0.01-0.1% of PMCA from the total erythrocyte membrane protein, the use of this system is highly relevant, given the fact that it is directly derived human tissue (Knauf *et al.*, 1974).

A second reason could be the lipid composition of membranes from erythrocytes versus RS membranes from rabbit's muscle. The phospholipids/cholesterol ratio was determined to be 0.96 for membrane of erythrocyte, which means that the amount of both lipids is equilibrated in this membrane type (Gottfriedg, 1967). However, in SR this ratio is totally different and it was determined to be 0.05 (Waku and Nakazawa, 1964). ATPases in general, are lipid-dependent proteins and function of the ATPase is highly dependent of the chemical composition and physical phase of the lipids surrounding the protein (Lee, 1998). This may be the case of the compounds studied here, were they may modify in some degree the lipid environment that surround the ATPase, thus affecting ATPase function.

It has been shown that cypermethrin, deltamethrin and glyphosate induce the production of reactive oxygen species (ROS) in different model organisms; however we did not evaluate the production of ROS in our *in vitro* model and in presence of cypermethrin, deltamethrin or glyphosate (Giray *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007; Ahsan *et al.*, 2008). Even though there is a remote possibility of having ROS production in pure and washed membranes, which will lead to lipid peroxidation of the lipids in our membrane model, we concluded that we did not have an electron source (such as the

ones found in a living model) that is required for ROS production. In addition, there is no way for these compounds under study to enter into a redox cycle or be biotransformed in a redox cycler that may lead to ROS production without the cellular components required for ROS production in our test tube. Moreover, several investigations had shown that herbicides like paraquat targets neurons, where it mediated the generation of ROS (Corasaniti *et al.*, 1992). Generation of ROS mediated by these compounds demonstrated how toxic these compounds really are when they enter a living cell. However, our findings contributed to show additional toxic effects produced by these compounds. In addition to ROS production cited in the literature, these compounds also affect Ca<sup>2+</sup> homeostasis, by affecting Ca<sup>2+</sup>-carriers such as Ca<sup>2+</sup>-ATPases.

Finally, SERCA and PMCA are different proteins in terms of their pharmacological sensitivity, as it has been demonstrated by the use of several inhibitors. The effects caused by pesticides on the biochemical level are still poorly understood. However, it is clear that some pesticides could exert their toxic effects by interfering with membrane-bound enzymes such as PMCA and SERCA, thus disrupting Ca<sup>2+</sup> homeostasis. Calcium is critical for cell function, since cells are not able to survive in the absence of Ca<sup>2+</sup>, but an excess of the ion can also be lethal, since it can lead to apoptosis (Lam *et al.*, 1994).

## Conclusion

Our results do not necessarily reflect the concentrations that may produce poisoning, but they are helpful in understanding the effects of cypermethrin, deltamethrin and glyphosate on the biological systems studied in this investigation. The present study concludes that PMCA activity was significantly affected by the pesticides studied and future investigations should focus on the molecular mechanism behind this effect. SERCA was unaffected by deltamethrin and glyphosate. This may be due the lipidic nature of this membrane and the closed-membrane (SR


vesicle) system employed in this study. The effect of pyrethroids and organophosphorates in PMCA should affect Ca<sup>2+</sup> homeostasis and their consequences still need to be elucidated. An inhibition on SERCA and PMCA activities should produce an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration with may kill a cell.

## Acknowledgements

This project was supported by the grant CONACYT CHIH-2006 C01-57268 (Mexico).

## References

- AHSAN, N., D.G. Lee, K.W. Lee, I. Alam, S.H. Lee, J.D. Bahk, and B.H. Lee. (2008). Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. *Plant Physiol Biochem.* 46(12):1062-70.
- ALAVANJA, M.C., J.A. Hoppin, and F. Kamel. 2004. Health effect of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health* 25:155-197.
- ANTUNES-MADEIRA, M.C., R.A. Videira, and V.M. Madeira. 1994. Effects of parathion on membrane organization and its implications for the mechanisms of toxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 1190(1):149-154.
- BAYKOV, A.A., O.A. Evdushenko, S.M. Aavaeva. 1988. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* 171(2):266-270.
- BENAIM, G., V. Cervino, C. Lopez-Estraño, and C. Weitzman. 1994. Ethanol stimulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1195(1): 141-8.
- BERLIN, J.R., T. Akera, T.M. Brody, and F. Matsumura. 1984. The inotropic effects of a synthetic pyrethroid on isolated guinea pig atrial muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 98(3-4):313-322.
- BHALLA, P., and D. Agrawal. 1998. Alterations in rat erythrocyte membrane due to hexachlorocyclohexane (technical) exposure. *Hum. Exp. Toxicol.* 17(11):638-642.
- BLASIAK, J. 1995. Cooperative binding of the organophosphate paraoxon to the (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase. *Z. Naturforsch. C.* 50(9-10):660-663.
- BLINKS, J., W. Wier, P. Hess, and F. Prendergast. 1982. Measurement of Ca<sup>2+</sup> concentrations in living cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 40(1-2):1-114.
- CARAFOLI, E. (1992). The Ca<sup>2+</sup> pump of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 267(4):2115-2118.
- CARAFOLI, E. (2002). Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(3):1115-1122.
- CHEFURKA, W., R.C. Chatelier, and W.H. Sawyer. 1987. Perturbation of phospholipid bilayers by DDT. *Biochim. Biophys. Acta* 896(2):181-186.
- CLARK, J.M., and F. Matsumura. 1987. The action of two classes of pyrethroids on the inhibition of brain Na-Ca and Ca+Mg ATP hydrolyzing activities of the American cockroach. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 86(1):135-145.
- CORASANITI, M.T., G. Bagetta, P. Rodinò, S. Gratteri, and G. Nisticò. 1992. Neurotoxic effects induced by intracerebral and systemic injection of paraquat in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 11(6): 535-9.
- COURTNEY, K.D. 1979. Hexachlorobenzene (HCB): a review. *Environ. Res.* 20(2):225-266.
- CREMER, J.E. 1983. The influence in mammals of the pyrethroid insecticides. *Dev. Toxicol. Environ. Sci.* 11:61-72.
- DEAMER, D.W., and R.J. Baskin. 1969. Ultrastructure of sarcoplasmic reticulum preparations. *J. Cell Biol.* 42(1):296-307.
- DE ROOS, A.J., A. Blair, J.A. Rusiecki, J.A. Hoppin, M. Svec, M. Dosemeci, D.P. Sandler, and M.C. Alavanja. 2005. Cancer incidence among Glyphosate-exposed pesticide applicators in the agricultural health study. *Environ. Health Perspect.* 113(1):49-54.
- DIEL, F., B. Horr, H. Borck, and T. Irman-Florjanc. 2003. Pyrethroid insecticides influence the signal transduction in T helper lymphocytes from atopic and nonatopic subjects. *Inflamm. Res.* 52(4):154-163.
- DUCHNOWICZ, P., and M. Koter. 2003. Damage to erythrocyte membrane caused by chlorophenoxyacetic herbicides. *Cell Mol. Biol. Lett.* 8(1):25-30.
- ELETR, S., and G. Inesi. 1972. Phospholipid orientation in sarcoplasmic membranes: spin-label ESR and proton MNR studies. *Biochim. Biophys. Acta* 282(1):174-179.
- FABIATO, A., and F. Fabiato. 1979. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J. Physiol.* 75(5):463-505.
- GIRAY B, A. Gürbay, and F. Hincal. (2001). Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. *Toxicol. Lett.* 118(3):139-46.
- GOTTFRIEDG, E.L. 1967. Lipids of human leukocytes: relation to cell type. *J. Lipid Research.* 8: 321-327.
- GROSMAN, N., and F. Diel. 2005. Influence of pyrethroids and piperonylbutoxide on the Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of rat brain synaptosomes and leukocyte membranes. *Int. Immunopharmacol.* 5(2):263-270.
- HAZARIKA, A., S.N. Sankar, and M.Kataria. 2001. Subacute toxicity of anilofos, a new organophosphate herbicide in male rats: effect on lipid peroxidation and ATPase activity. *Indian J. Exp. Biol.* 39(11):1113-1117.
- JANIK, F., and H.U. Wolf. 1992. The Ca(2+)-transport-ATPase of human erythrocytes as an in vitro toxicity test system—acute effects of some chlorinated compounds. *J. Appl. Toxicol.* 12(5):351-358.
- JONES, O.T., R.J. Froud, and A.G. Lee. 1985. Interactions of hexachlorocyclohexanes with the (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>)-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta.* 812(3):740-751.
- KAKKO, I., T. Toimela, and H. Tahti. 2003. The synaptosomal membrane bound ATPase as a target for the neurotoxic effects of pyrethroids, permethrin and cypermethrin. *Chemosphere* 51(6):475-480.
- KHAN, S.Z., C.L. Longland, and F. Michelangeli. 2000. The effects of phenothiazines and other calmodulin antagonists on the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca(2+) pumps. *Biochem. Pharmacol.* 60(12):1797-1806.
- KNAUF, P.A., F. Provervio, and J.F. Hoffmann. 1974. Electrophoretic separation of different phosphoproteins associated with Ca<sup>2+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in human red cell ghosts. *J. Gen. Physiol.* 63(3):324-336.
- KODAVANTI, P.R., W.R. Mundy, H.A. Tison, and G.J. Harry. 1993. Effects of selected neuroactive chemicals on calcium transporting systems in rat cerebellum and on survival of cerebellar granule cells. *Fundam. Appl. Toxicol.* 21(3):308-16.
- LAM, M., G. DUBYAK, L. Chen, G. Nuñez, R.L. Miesfeld, C.W. Distelhorst. 1994. Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91(14):6569-6573.

- LANZETTA, P.A., L.J. Alvarez, P.S. Reinach, and O.A. Candia. 1979. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* 100(1):95-97.
- LAX, A., F.Soler, and F. Fernandez-Belda. 2002. Inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase by miconazole. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283(1):C85-92.
- LEE, A.G. 1998. How lipids interact with an intrinsic membrane protein: the case of the calcium pump. *Biochim. Biophys. Acta.* 1376(3):381-90.
- LI, H.Y., Y.F. Zhong, S.Y. Wu, and N. Shi. (2007). NF-E2 related factor 2 activation and heme oxygenase-1 induction by tert-butylhydroquinone protect against deltamethrin-mediated oxidative stress in PC12 cells. *Chem. Res. Toxicol.* 20(9):1242-51.
- LIN, T., and M. Morales. 1977. Application of a one-step procedure for measuring inorganic phosphate in the presence of proteins: the actomyosin ATPase system. *Anal. Biochem.* 77(1):10-17.
- LOWRY, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1):265-275.
- MADSEN, C., M.H. Claesson, and C. Ropke. 1996. Immunotoxicity of the pyrethroid insecticides deltamethrin and alpha-cypermethrin. *Toxicology* 107(3):219-227.
- MARC, J., O. Mulner-Lorillon, S. Boulben, D. Hureau, G. Durand, and R. Belle. 2002. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chem. Res. Toxicol.* 15(3):326-331.
- MICHELANGELI, F., M.J. Robson, M.J. East, and A.G. Lee. 1990. Fluorescence and kinetic studies of the interactions of pyrethroids with (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1028(1):58-66.
- MICHELANGELI, F., M.J. Robson, M.J. East, and A.G. Lee. 1990. Fluorescence and kinetic studies of the interactions of pyrethroids with (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1028(1):58-66.
- MOYA-QUILES, M.R., E. Munoz-Delgado, and C.J. Vidal. 1996. Effects of the pyrethroid insecticide permethrin on membrane fluidity. *Chem. Phys. Lipids.* 79(1):21-28.
- NARAHASHI, T. 1996. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol. Toxicol.* 79(1):1-14.
- NIGGLI, V., J.T. Penniston, and E. Carafoli. 1979. Purification of the (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J. Biol. Chem.* 254(20):9955-9958.
- PLENGE-TELLECHEA, F., F. Soler, F. Fernandez-Belda. 1999. Tricyclic antidepressants inhibit the Ca(2+)-dependent ATPase activity from plasma membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* 370(1):119-125.
- PRICE, N.R. 1976. The effect of two insecticides on the Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-activated ATPase of the sarcoplasmic reticulum of the flounder, *Platichthys flesus*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 55(2):91-94.
- RANDI, A. S., H.A. Sancovich, A.M. Ferramola de Sancovich, A. Loaiza, L. Krawiec, and D.L. Kleiman de Pisarev. 1998. Hexachlorobenzene-induced alterations of rat hepatic microsomal membrane function. *Toxicology.* 125(2-3):83-94.
- SAHIB, I.K., and D. Desai. 1987. Inhibition of beta-adrenergic stimulated calcium pump of rat cardiac sarcoplasmic reticulum by tricyclohexyltin hydroxide. *Cell Biochem. Funct.* 5(2):149-54.
- SAHIB, I.K., K.S. Prasada Rao, and D. Desai. 1987. Pyrethroid inhibition of basal and calmodulin stimulated Ca<sup>2+</sup> ATPase and adenylate cyclase in rat brain. *J. Appl. Toxicol.* 7(2):75-80.
- SALAS, V., and P.J. Romero. 1996. Effects of trifluralin and oryzalin on the human erythrocyte Ca-ATPase. *Pharmacol. Toxicol.* 78(6):439-440.
- SENGER, M.R., E.P. Rico, M. de Bem Ariz, D.B. Rosemberg, R.D. Dias, M.R. Bogo, and C.D. Bonan. 2005. Carbofuran and malathion inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicology.* 212(2-5):107-15.
- SODERLUND, D. M., J.M. Clark, L. P. Sheets, L.S. Mullin, V.J. Picirillo, D. Sargent, J.T. Stevens, and M.L. Weiner. 2002. Mechanisms of pyrethroids neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology.* 171(1):3-59.
- SOUZA DA SILVA, R., P. Cognato Gde, F.C. Vuaden, M.F. Rezende, F.V. Thiesen, G. Fauth Mda, M.R. Bogo, C.D. Bonan and R.D. Dias. 2003. Different sensitivity of Ca(2+)-ATPase and cholinesterase to pure and commercial pesticides in nervous ganglia of *Phyllocaulis soleiformis* (Mollusca). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 135(2):215-20.
- STEINRUCKEN, H.C., and N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94(4):1207-1212.
- WAKU AND NAKAZAWA, 1964. On the lipids of rabbit sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem.* 56:95-6.
- WEISS, B., S. Amler, and R.W. Amler. 2004. Pesticides. *Pediatrics.* 113(4):1030-1036.
- ZAIDI, A., D. Fernandes, J.L. Bean, and M.L. Michaelis. (2009). Effects of paraquat-induced oxidative stress on the neuronal plasma membrane Ca(2+)-ATPase. *Free Radic. Biol. Med.* 47(10):1507-14. 

---

Este artículo es citado así:

Vargas-Medrano, J., J. A. Sierra-Fonseca, M. Arellano-Carrillo and F. Plenge-Tellechea. 2011: *Cypermethrin, deltamethrin and glyphosate affect the activity of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase from human erythrocyte*. *TECNOCIENCIA Chihuahua* 5(3): 121-131.

## Resúmenes curriculares de autor y coautores

**JAVIER VARGAS MEDRANO.** Originario de Ciudad Juárez, ingresó al programa de Biología de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez en 1999, como parte de la primera generación del naciente programa. Ahí realizó su función de técnico de investigación y su tesis de licenciatura en el área de bioquímica, bajo la dirección del Dr. Plenge Tellechea, analizando el efecto de diferentes estructuras químicas de diclorobenzenos (precursores de pesticidas) sobre proteínas transportadoras de calcio. Después de obtener su licenciatura, ingresó a la Universidad de Texas en El Paso, donde comenzó su tesis doctoral estudiando como un proceso postraduccional, la fosforilación del transportador de glicina del cerebro era capaz de regular los flujos de glicina, lo cual en la clínica puede ser un prometedor tratamiento a esquizofrenia. Durante sus estudio doctoral fue distinguido dos veces como asistente de investigación con fondos del National Institute of Health and National Institute of Mental Health de los Estados Unidos. Finalmente, obtuvo el doctorado en el 2010. En el 2011, fue distinguido con el Hispanic Training Fellowship para ocupar la posición de Postdoctoral-Research Associate en el Texas Tech Health Science Center en el Paso Texas. Actualmente, el doctor se encuentra inmerso en varias investigaciones sobre una de las proteínas (CCR5) responsables de la entrada del virus del SIDA a las células.

**JORGE ANÍBAL SIERRA FONSECA.** Se graduó del programa de Licenciatura en Biología de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ) en el año 2007. Posteriormente inició sus estudios de posgrado en la Universidad de Texas en El Paso (Texas, EUA), donde fue admitido en el programa de doctorado en Ciencias Biológicas/Patobiología. Actualmente cursa su tercer año en el programa de doctorado, donde además de desarrollar su proyecto de investigación, también funge como instructor asistente en diversos cursos de licenciatura. Ha asistido a diversos congresos locales, regionales, nacionales e internacionales, donde ha presentado los resultados de diversos proyectos de investigación. Actualmente se encuentra estudiando el papel de las proteínas G heterotrimericas en la organización del citoesqueleto durante la diferenciación neuronal y neurodegeneración, utilizando diversos modelos celulares. Sus intereses incluyen biología celular, neurociencias, señalización celular y cáncer.

**MANUEL DAVID ARELLANO CARRILLO.** En el año 2009 obtuvo el grado de Licenciado en Biología en la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez con el tema de tesis: Interacción de plaguicidas sobre la actividad enzimática de la ATPasa de Ca<sup>2+</sup> de eritrocito humano (PMCA). Además, el biólogo ha participado en diversos congresos nacionales e internacionales entre los que destacan varios congresos nacionales de bioquímica y uno organizado por la American Chemical Society. Los trabajos de investigación donde ha colaborado se han publicado en diversas revistas tales como en la revista Ciencia en la Frontera. Actualmente, el biólogo realiza sus estudios en la Maestría con Orientación Genómica en la UACJ donde evalúa el efecto de deltametrina sobre la expresión de diversos genes en Linfocitos T humanos.

**LUIS FERNANDO PLENGE TELLECHEA.** Desde 1990 ingresó como becario interno del laboratorio de reproducción en la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California. En 1992 culminó sus estudios de Biología en la misma dependencia. Posteriormente realizó sus estudios de Doctorado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Murcia, culminando en 1998. El Dr. Plenge se ha caracterizado por sus estudios bioquímicos en la rama de proteínas asociadas en membranas. Actualmente labora como profesor investigador de tiempo completo en la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Cuenta con múltiples publicaciones y dirección de tesis de pregrado y de grado. Es actual director en jefe de la revista de ciencias, Ciencia en la Frontera, e imparte la cátedra de Bioquímica en el programa de Biología y de Estructura y función proteínas en la Maestría en Ciencias con orientación en genómica (PNP). Actualmente se encuentra de reingreso a la UACJ posterior a una estancia Posdoctoral en el Border Biomedical Research Center de la Universidad de Texas at El Paso desde 2010 a Julio del presente, donde estudió los mecanismos bioquímicos de neurotransportadores de dopamina y glicina así como escritura de trabajos científicos.

# Método para la extracción de ADN cloroplastídico de *Bouteloua gracilis* como herramienta para aplicaciones moleculares

## Method of chloroplast DNA extraction from *Bouteloua gracilis* as a tool for molecular applications

DAVID I. HERNÁNDEZ-QUEZADA<sup>1</sup>, SIGIFREDO ARÉVALO-GALLEGOS<sup>1</sup>, DAVID A. BETANCOURT-GUERRA<sup>1</sup>,  
ARMANDO AGUADO-SANTACRUZ<sup>2</sup>, TANIA SIQUEIROS-CENDÓN<sup>1</sup>, BLANCA RIVERA-CHAVIRA<sup>1</sup>,  
GUADALUPE VIRGINIA NEVÁREZ-MOORILLON<sup>1</sup> Y QUINTÍN RASCÓN-CRUZ<sup>1,3</sup>

Recibido: Mayo 10, 2011

Aceptado: Octubre 24, 2011

### Resumen

La manipulación genética del genoma de cloroplasto esta a la vanguardia en investigación biotecnológica. El pasto *B. gracilis* es un modelo para el estudio de estrés hídrico y oxidativo, capacidades relacionadas al cloroplasto. Es necesario tener un método que facilite la obtención de ADN de buena calidad, particularmente cuando se refiere al ADN de cloroplasto de *B. gracilis*. La implementación de un método para la extracción de cpADN se logró probando diferentes estrategias de extracción de cpADN reportados en la literatura y combinando las etapas más apropiadas para *B. gracilis*. La incorporación de un paso adicional del lavado con CTAB permitió la recuperación de cpDNA enriquecido, el cual se puede utilizar en el desarrollo de hermanitas moleculares. Debido a la implementación de un protocolo de extracción también fue posible obtener una cantidad considerable de cpADN de *B. gracilis*. El cpADN fue digerido con varias enzimas de restricción y los fragmentos resultantes fueron analizados por Southern blot con las sondas de los genes de rADN 16S y 23S. Con base en los perfiles de restricción, en este trabajo se reporta un mapa parcial de restricción del genoma del cloroplasto de *B. gracilis* y se plantea que la metodología aquí establecida en un futuro permitirá abordar la manipulación genética del genoma de cloroplasto.

**Palabras clave:** Análisis molecular, clonación de genes, mapa genético, transferencia horizontal de genes.

### Abstract

Genetic manipulation of the chloroplast genome is at the forefront of biotechnology research. *B. gracilis* is a model for the study of water stress and oxidative capacities related to the chloroplast. It is required a method to facilitate the obtaining of good quality DNA, particularly when it comes to chloroplast DNA of *B. gracilis*. The implementation of a method for extracting cpDNA was achieved by assaying different strategies cpDNA extraction reported in the literature and combining the most appropriate stage for *B. gracilis* for cpDNA extraction. The incorporation of an additional step of washing with CTAB after lysis of chloroplasts, allowed the recovery of enriched cpDNA which can be used in the development of molecular tools. Due to the implementation of an extraction protocol was also possible to obtain a considerable amount of *B. gracilis* cpDNA. The cpDNA was digested with several restriction enzymes and the resulting fragments were analyzed by Southern blot with probes of genes 16S and 23S rDNA. The method developed allowed us to obtain a considerable amount of cpDNA of *B. gracilis* which can be cut with restriction enzymes and used for genetic mapping. These results allow us in future work for the genetic manipulation of the chloroplast genome.

**Keywords:** Molecular analysis, gene cloning, gene mapping, horizontal gene transfer

### Introducción

Las células de las plantas verdes y algunos protistas contienen organelos llamados cloroplastos; estos organelos pueden convertir la luz en energía química utilizable por el organismo (Blaustein *et al.*, 1998). Los cloroplastos son organelos intracelulares que contienen la maquinaria necesaria para los procesos involucrados en la fotosíntesis. Estos participan en la biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos, lípidos y carbohidratos (Sugiura, 1992).

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua. Campus Universitario II. Apdo. Postal 1542-C. Chihuahua, Chih., México. 31125. Tel. (614) 236-6000.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Carretera Celaya-San Miguel de Allende S/N CP.30110. Celaya, Gto. México.

<sup>3</sup> Dirección electrónica del autor de correspondencia: qrascon@uach.mx.

Al igual que las mitocondrias, el estroma de un cloroplasto alberga pequeñas moléculas de ADN circular de doble cadena y ribosomas similares a las procariotas. El estudio de esta molécula promete ser una alternativa para el desarrollo biotecnológico de gramíneas de importancia en campos como la ganadería y la agricultura, además de ser una herramienta útil en el estudio de las características fisiológicas relacionadas con el cloroplasto. En 1963 se comprobó que los cloroplastos contenían su propio ADN (Sager e Ishida, 1963); el ADN del cloroplasto (cpADN) es un remanente de genomas de un simbiote bacteriano ancestral. Dependiendo del organismo, el cloroplasto contiene de 60 a 200 genes que participan en la expresión génica (Leister, 2003). El tamaño de la molécula de ADN cloroplastídico puede variar, dependiendo de la especie, entre 120 y 170 Kb (Palmer, 1987). En los años 80 surgió la idea de realizar ingeniería genética dentro del cloroplasto (Daniell *et al.*, 2002), desde entonces, el estudio del cpADN de diferentes especies se ha perfilado como uno de los objetivos de la manipulación genética (Bogorad, 2000). Ya se ha logrado insertar genes heterólogos en el genoma de cloroplasto; se han expresado antígenos para la elaboración de vacunas dentro de este organelo (Chebolu y Daniell, 2007; Tregoning *et al.*, 2003), así como proteínas de interés farmacéutico como el IGF-1 (Ruiz, 2002). La modificación genética dentro del cloroplasto tiene ventajas cuando se compara con la modificación de ADN nuclear, debido a que las condiciones internas del cloroplasto presentan menos mecanismos de regulación debido a su carácter procariótico (Koya y Daniell, 2005). Además, la característica de mayor interés del cloroplasto es la manera como se transfiere a su descendencia preferentemente vía materna, lo que hace a este organelo un contenedor de genes con capacidad para evitar la liberación de polen transgénico (Scotty Wilkinson, 1999), es decir, evitar la transferencia horizontal de genes.

La línea de investigación está enfocada al estudio del cpADN de *B. gracilis* (navajita azul), el cual es un pasto forrajero presente en amplias regiones del continente (García-Sánchez y Monroy-Ata, 2005) y posee importantes características relacionadas a la resistencia al estrés hídrico. El interés del grupo de investigación es desarrollar metodologías moleculares para el análisis de la organización de los genes cloroplastídicos debido a dos características importantes de este organelo y su ADN: uno, participa bioquímica y molecularmente en el desarrollo y adaptación de la planta al medio ambiente y dos, los caracteres codificados en el genoma cloroplastídico sólo se segregan vía materna.

El primer paso para realizar investigación relacionada con ADN de cloroplasto fue elaborar una estrategia que permitiera obtener fracciones enriquecidas de cpADN de buena calidad y en cantidad suficiente para llevar a cabo los experimentos necesarios dentro del laboratorio. Se han desarrollado varios métodos para la extracción de cpADN, la mayoría de los métodos contienen tres etapas principales: 1) La separación de los cloroplastos de otros organelos, 2) La lisis de los cloroplastos y 3) La purificación del cpADN (Jansen *et al.*, 2005). Algunos métodos utilizan gradientes de sacarosa (Palmer, 1987), soluciones con altas concentración de NaCl (Bookjans *et al.*, 1984) y tratamiento con DNAsa 1 (Kolodner y Tewari, 1979). Nuestro grupo de investigación, utilizando un método salino sin DNAsa, logró extraer suficiente ADN para hacer análisis molecular; sin embargo, es un método que no resultó eficiente y simple para la recuperación de ADN de cloroplasto enriquecido (Aguado *et al.*, 2011). Se ha reportado que la extracción de cpADN en plantas pertenecientes a la familia *Poaceae* es difícil de realizar debido a las características fisiológicas de las plantas por su alto contenido de lignina y polisacáridos (Diekmann *et al.*, 2008), y en algunos casos ha sido necesaria la adición de etapas de purificación del ADN durante la extracción del cpADN (Virupakshi y Naik, 2007).

En el presente trabajo se desarrolló un método de extracción donde, el primer objetivo fue mejorar el rendimiento para la obtención de cpADN; el segundo objetivo fue recuperar cpADN con una pureza tal que fuera posible realizar un patrón de digestión y mapa genético parcial de un segmento del cpADN de *Bouteloua gracilis*, como herramienta molecular.

## Materiales y métodos

*Extracción ADN cloroplastídico de *Bouteloua gracilis*.* Se colocaron 40 gramos de células clorofilicas (c.c.) con 180 ml de buffer de extracción (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 0.1% BSA, 0.1%  $\beta$ -mercaptoetanol). La mezcla se licuó por 2 min (en un vaso previamente enfriado), en lapsos de 30 s cada vez. El homogenizado fue filtrado a través de ocho capas de gasa y recuperado en un recipiente estéril y frío. El filtrado fue centrifugado a 1,000 rpm por 20 min a 4°C, trasladando el sobrenadante a un recipiente limpio y descartando la pastilla, la cual contenía restos celulares y células no lisadas. El sobrenadante fue centrifugado a 4,500 rpm por 20 min a 4°C con el fin de empaquetar los cloroplastos (pastilla enriquecida con cloroplastos), dejando en la suspensión las mitocondrias. Con cuidado, la pastilla se resuspendió con 5 ml de buffer de lavado frío (0.35 M Sorbitol, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA) para no lisar los cloroplastos. Después, se agregaron 50 ml de buffer de lavado y se centrifugó a 4,500 rpm por 20 min a 4 °C. La pastilla se resuspendió con una pipeta de boca ancha en 1 ml de amortiguador de resuspensión frío (100 mM Tris-HCl, pH 7.2, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.2% b-mercaptoetanol) y se transfirió a tubos de 1.5 ml, repartiendo en volúmenes iguales (650 ml). A los tubos se les agregó 60 ml de SDS al 10%, y se mezcló; los tubos se calentaron a 60 °C en baño María por 5 min. Después de la lisis, a los tubos se les agregó 3 ml de RNasa (10 mg/ml), 5 ml de proteinasa K (10 mg/ml) y 30 ml de SDS al 10%, esta solución se incubó durante 25 min a 37°C; se agregaron 100 ml de 5 M NaCl y 80 ml de solución CTAB/

NaCl (10% CTAB, 0.7 M NaCl); se incubó durante 15 min a 65°C, posteriormente se agregó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó durante 5 min, los tubos se centrifugaron por 10 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente, se descartó la fase fenólica y la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio. A la fase acuosa se le agregó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó durante 5 min, el tubo se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa, se transfirió a un tubo limpio y se agregó 1/10 de volumen de acetato de amonio 5 M y 1 volumen de isopropanol, La mezcla se incubó toda la noche a -20 °C. Al siguiente día, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C; se descartó el sobrenadante y al precipitado se le agregó un volumen de etanol al 7%; se centrifugó en las condiciones anteriores. Se decantó el etanol y a la pastilla resultante se le agregó un volumen de etanol absoluto y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min a 4°C. Se descartó el etanol, la pastilla se secó a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en 10 ml de agua destilada estéril. Para la cuantificación del ADN, se realizó una dilución 1:100 con agua destilada estéril. La dilución se analizó a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (SmartSpec 3000, BioRad).

*Marcaje de sondas de las sondas 16S y 23S ribosomales con digoxigenina.* Las sondas se marcaron mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa incorporando dUTP-digoxigenina en los fragmentos de los genes de interés (Hoisington *et al.*, 1994) e iniciadores específicos para cada sonda. La reacción (volumen final 50 ml) contuvo 1X Taq Buffer, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP's, 2.4 nM dTTP-Dig, 2  $\mu$ M Forward y Reverse Oligonucleótido, 2 U de Taq polimerasa y 10 ng de ADN). Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C/ 3 min desnaturalización inicial, 95 °C/30 s desnaturalización, 60 °C/40 s alineamiento, 72 °C /40 s extensión, durante 35 ciclos y una xtensión final de 10 min a 72 °C.



**Detección de genes por hibridación tipo Southern blot.** Las muestras de cpADN sometidas a digestión con enzimas de restricción, fueron separadas electroforéticamente en geles de agarosa y antes de la transferencia el gel fue depurinado con 100 mM HC por 30 min y luego desnaturalizado con 1.5 M NaCl y 200 mM NaOH durante 30 min. La transferencia del ADN a membranas de nylon se realizó de acuerdo con lo reportado por Southern (1975). Se realizó una pre-hibridación e hibridación en tubos de vidrio dentro de un horno a 65 °C con solución HYB (5 X SSC, 0.1% Laurilsarcosina, 0.2% SDS, 1% Reactivo de bloqueo) suplementado con 1 ng/ml de sonda marcada con digoxigenina específica para cada gen, siguiendo las instrucciones descritas por Hoisinton *et al.* (1994). La detección inmunológica y el revelado quimioluminiscente (CSPD-Star) se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Kessler *et al.* (1990).

## Resultados y discusión

**Implementación de la extracción de cpDNA.** El método desarrollado consiste en varias etapas de fácil realización, como la molienda, eliminación de contaminantes de elevado peso molecular y la separación de los cloroplastos mediante centrifugación; también contiene soluciones diseñadas para la disolución de ADN nuclear contaminante (Bookjans *et al.*, 1984; Triobush *et al.*, 1998; Virupakshi y Naik, 2007). Contiene una etapa de purificación de ácidos nucleicos haciendo uso de la estructura molecular y de las características fisicoquímicas del detergente Bromuro Cetiltrimetilamonio (CTAB). En este método, el punto clave para la obtención de cpADN puro e íntegro es la extracción con el detergente CTAB, esto se debe a que este detergente se adhiere a estructuras con características fisicoquímicas similares a los sacáridos, polisacáridos y polifenoles; en bajas concentraciones iónicas, el detergente se une a la estructura de los sacáridos de los ácidos nucleicos; al elevar la polaridad del medio en el que se encuentra el CTAB debilita su adhesión

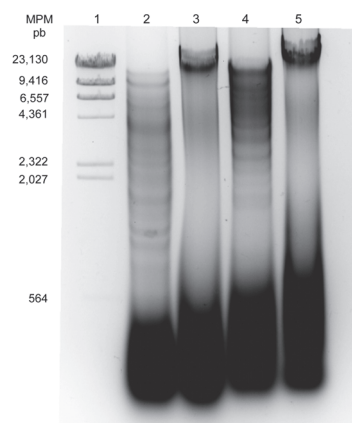
(Virupakshi y Naik, 2007). Este tratamiento permitió obtener una pastilla de cpADN con la calidad suficiente para ser tratada con diferentes enzimas de restricción.

Como material inicial se utilizaron 40 g de células clorofílicas de *B. gracilis* y 25 g de acelga (*Beta vulgaris*) esta última como control de extracción. Se obtuvo un mayor rendimiento en la cantidad de cpADN obtenida en *B. vulgaris* debido a su alto contenido de cloroplastos; el rendimiento para las células clorofílicas (c.c.) de *B. gracilis* aumentó (Cuadro 1), en comparación al rendimiento promedio obtenido en la misma especie al utilizar el método salino (Bookjans *et al.*, 1984). Cuatro mg de cpADN de *B. vulgaris* y de c.c. de *B. gracilis* se digirieron con EcoRI, el producto obtenido fue separado mediante electroforesis en un gel de agarosa (Figura 1); con la finalidad de observar la integridad del cpADN.

**Cuadro 1.** Concentraciones de cpDNA obtenidas a partir de células clorofílicas de *B. gracilis* y *B. vulgaris* con el método salino modificado con CTAB.

Material inicial	Concentración (ng/μl)	Abs 260/280 nm	Total (μg)	Rendimiento (μg/g)
C.c. de <i>B. gracilis</i>	2.6	1.89	104	2.6
<i>B. vulgaris</i>	2.8	1.85	140	5.6

**Figura 1.** Separación electroforética de la digestión de cpDNA de c.c. de *B. gracilis* y *B. vulgaris*. Carril 1, marcador I-HindIII; carril 2 cpDNA de *B. vulgaris* con EcoRI; carril 3, cpDNA *B. vulgaris* sin cortar; carril 4 cpDNA de c.c. de *B. gracilis* con EcoRI; carril 5, cpDNA de c.c. de *B. gracilis* sin cortar.



En la Figura 1 se observó un patrón de digestión para ambas especies en los carriles 2 y 4 (*B. gracilis* y *B. vulgaris*). Es posible observar en los carriles 3 y 5 una banda de ADN de alto peso molecular que corresponde al cpADN no cortado. En la parte inferior de los carriles se observó una cantidad considerable de ARN. Los resultados de la pureza y digestión del ADN son similares a lo reportado por Bookjans *et al.* (1984) y por Triobush (1998).

La adición de RNAsa antes de la lisis cloroplastídica elimina la presencia de ARN, por lo que la cuantificación se atribuye a la presencia de cpADN. En el análisis espectrofotométrico se observó una relación en la absorbancia 260/280 cercana al 2.0, esto indica que la pureza del cpADN es buena (Cuadro 2) y que la absorbancia es debida preferentemente a la presencia de cpADN y no a ARN (Figura 2). Si bien el rendimiento en mg/g fue inferior, se mantuvo la cantidad de cpADN recuperado (Cuadro 2).

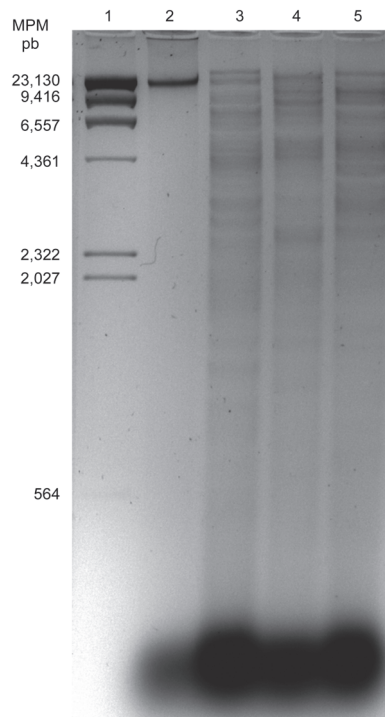
**Cuadro 2.** Concentraciones de cpDNA obtenidas a partir de c.c. de *B. gracilis* con el método salino modificado con CTAB mas RNAsa.

Material inicial	Concentración (ng/μl)	Abs 260/280 nm	Total (μg)	Rendimiento (μg/g)
C.c. de <i>B. gracilis</i> 1	3.345	1.98	133	3.325
C.c. de <i>B. gracilis</i> 2	3.590	1.99	144	3.6

El cpADN obtenido a partir de *B. gracilis* fue cortado con diferentes enzimas de restricción. En la Figura 2 es posible observar que se presentó un patrón de digestión claro para las tres enzimas utilizadas (EcoRI, BamHI, HindIII).

En la Figura 2 se observó también menor cantidad de RNA comparado con la Figura 1 debido al uso de RNAsa. Se observó que con este método la banda de cpADN de *B. vulgaris* y de c.c. de *B. gracilis* (Figura 1) fue semejante en intensidad e integridad, por lo que se puede inferir que el tratamiento con el detergente CTAB no afectó la integridad de ADN y permitió obtener cantidades similares de ADN, en detrimento del rendimiento.

**Figura 2.** Separación electroforética de la digestión cpDNA de c.c. de *B. gracilis*. Carril 1, MPMI-HindIII; carril 2, cpDNA c.c. de *B. gracilis* sin digerir; carril 3, cpDNA c.c. de *B. gracilis* con EcoRI; carril 4, cpDNA c.c. de *B. gracilis* con HindIII; carril 5, cpDNA c.c. de *B. gracilis* con BamHI.



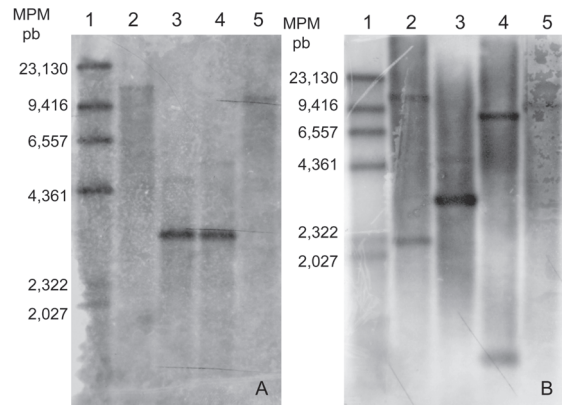
Se puede observar que el tratamiento con CTAB después de la lisis cloroplastídica permite separar al cpADN de contaminantes que en ocasiones inhiben la acción de las enzimas de restricción. El CTAB permite separar a las ribosomas de los ácidos nucleicos contaminantes, ya que estos tienen una estructura similar, que se adhieren a estos azúcares, como lo son los polisacáridos y polifenoles (Virupakshi y Nail, 2007). Existen por tanto compuestos contaminantes de características fisicoquímicas similares a las del ADN que son extraídas de manera simultánea.

Para mostrar el potencial uso de este método como herramienta para el análisis molecular, se realizó un mapa parcial de segmentos ribosomales del cpADN.

*Mapa de los genes de rADN 16S y 23S en el genoma cloroplastídico de B. gracilis.* Para la identificación del gen de rADN16S y 23S en el cpADN de *B. gracilis*, el cpADN se sometió a restricción con diferentes enzimas; los productos digeridos fueron separados electroforéticamente y transferidos a membranas de nylon; posteriormente mediante Southern blot con las ondas ribosomales 16S y 23S los genes arriba referidos fueron identificados en la membrana conteniendo el DNA digerido. En la Figura 3 A, se observa la hibridación de la sonda 16S ribosomal con fragmentos de 16000, 3300, 3300 y 12300 resultantes de la restricción con las enzimas EcoRI, EcoRI/BamHI, BamHI y HpaI, respectivamente. El gen ribosomal 23S mostró un perfil de hibridación distintivo, con fragmentos tanto de alto peso molecular como de bajo peso molecular (Figura 3B).

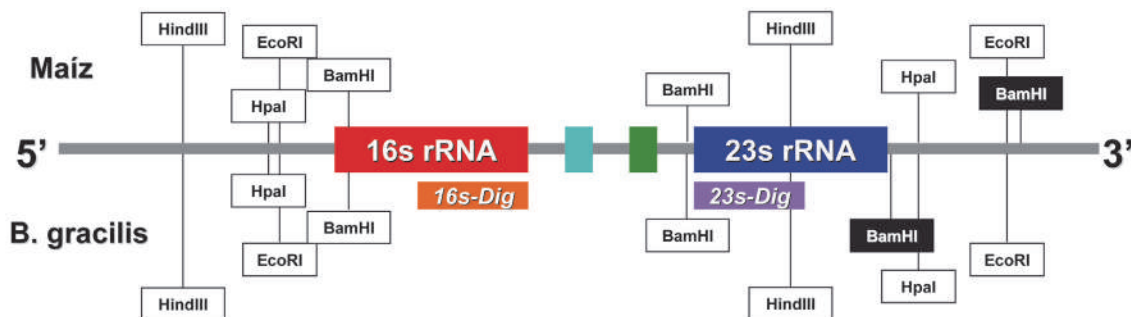
La hibridación con el 23S ribosomal (Figura 3B) muestra fragmentos de 15058, 3452, (8841, 890) y 11547 pb con las enzimas EcoRI, BamHI, HindIII y HpaI, respectivamente. En los carriles 5 de la Figura 3 A y B se corrió ADN de cpDNA de maíz como referencia debido a que el maíz y el zacate *B. gracilis* pertenecen a la misma familia. La combinación de estos datos de hibridación permitió elaborar un mapa parcial de restricción (Figura 4).

**Figura 3.** Hibridación tipo Southern blot del cpDNA de *B. gracilis* cortado con diferentes enzimas. **A.** Hibridación con sonda 16S. Carril 1, MPM λ HindIII-Dig; carril 2, cpDNA *B. gracilis* con EcoRI; carril 3, cpDNA *B. gracilis* con EcoRI y BamHI; carril 4, cpDNA *B. gracilis* con BamHI; carril 5, cpDNA *Z. mays* con HpaI. **B.** Hibridación con sonda 23S. Carril 1, MPM λ HindIII-Dig; carril 2, *B. gracilis* con EcoRI; carril 3, *B. gracilis* con BamHI; carril 4, *B. gracilis* con HindIII; carril 5, *Z. mays* con HpaI.



Debido a la conservación de los genomas de los cloroplastos en plantas, se consideró que el genoma de maíz puede servir como referencia. Esto se confirmó utilizando la base de datos de GeneBank y los genomas reputados de cpDNA de maíz (accesión AY928077) y *B. gracilis* (accesión EU282003) analizados utilizando la herramienta de Clustal X 2.0 (resultados no mostrados). La similitud entre los resultados esperados permitió asumir que los sitios de corte en *B. gracilis* se encuentran posicionados justo donde se espera que estén localizados los sitios en maíz, con excepción del sitio de corte para la enzima BamHI que está ubicado en diferente posición, quizá sea la única diferencia entre estos dos segmentos (Figura 4).


**Figura 4.** Mapa parcial de restricción de un repetido invertido del cpDNA de *Bouteloua gracilis* y *Zea mays*. El mapa comprende la secuencia presente entre los nucleótidos 90741 y 105618 del cpDNA de maíz, la diferencia encontrada en el sitio de restricción para la enzima BamHI se muestra en un recuadro negro.



## Conclusiones

En el método desarrollado se implementaron etapas de separación de los organelos basados en los métodos salinos reportados por Triobush en 1998 y por Bookjans en 1984 utilizando NaCl con la finalidad de eliminar ADN nuclear que pudiera estar adherido a las membranas cloroplastídicas. El paso incorporado es una etapa de purificación del cpADN con el detergente CTAB después de la lisis cloroplastídica, con el fin de eliminar contaminantes que se encuentran adheridos a los esqueletos de fosfato del cpDNA. El uso de RNAsa tiene un efecto positivo en la cantidad y calidad de cpDNA extraído en este método. La elaboración de un mapa parcial de restricción permite asumir que el método de extracción se puede utilizar para el desarrollo de herramientas moleculares y para el análisis el genoma cloroplastídico.

## Literatura citada

- AGUADO-SANTACRUZ, G.A., D.A. Betancourt-Guerra, T. Siqueiros-Cendón, S. Arévalo-Gallegos, B. Rivera-Chavira, G.V. Nevárez-Moorillon, B.M. Moreno-Gómez and Q. Rascón-Cruz. 2011. Comparison of the structure and organization of the rna operons of *Bouteloua gracilis* and *Zea mays*. *Can. J. Plant Sci.* 91:107-116.
- BLAUSTEIN, D.R., Johnson, and D. Mathieu. 1998. *Biology. The dynamics of life.* McGraw-Hill. Cap. 8:204.
- BOGORAD, L. 2000. Engineering chloroplasts; an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends Biotechnol.* 18:257-263.
- BOOKJANS, G., B.M. Stummann, and K. Henningsen. 1984. Preparation of chloroplast DNA from pea plastids isolated in a medium of high ionic-strength. *Anal. Biochem.* 141: 244-247.
- CHEBOLU, S. and H. Daniell. 2007. Stable expression of GAL/GALNAclectin of *Entamoeba histolytica* in transgenic chloroplast and immunogenicity in mice towards vaccine development for amebiasis. *Plant Biotech. J.* 2:230-239.
- DANIELL, H., M.S. Khan, and L. Allison. 2002. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.* 7:84-91
- DIEKMANN, K., T. Hodkinson, E. Fricke, and S. Barth. 2008. An optimized chloroplast DNA extraction protocol for grasses (*Poaceae*) proves suitable for whole plastid genome sequencing and SNP detection. *PLoS ONE* 3: 7.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, R., y A. Monroy-Ata. 2005. Micrositios del pasto navajita (*Bouteloua gracilis*) en comunidades de pastizal y de matorral del altiplano mexicano. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 8: 61-70.
- HOISINGTON, D., M. Khairallah, and D. González-De León. 1994. Laboratory protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. CIMMYT. pp 70.
- JANSEN, R.K., L.A. Raubeson, J.L. Boore, C.W. de Pamphilis, T.W. Chumley, R.C. Haberle, S. K. Wyman, A. J. Alverson, R. Peery, S. J. Herman, H. M. Fourcade, J. V. Kuehl, J. R. McNeal, J. Leebens-Mack, and L. Cui. 2005. Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences. *Meth. Enzymol.* 395: 348-384.
- KESSLER, C., H. Hölftke, R. Seibl, J. Buró, and K. Mühlegger. 1990. Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. A novel DNA labeling and detection system based on digoxigenin: Anti-digoxigenin ELISA Principle (digoxigenin system). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 371:917-927.
- KOLODNER, R., and K.K. Tewari. 1979. Inverted repeats in chloroplast DNA from higher plants. *Proc Natl. Acad. Sci.* 76: 41-45.
- KOYA, V., and H. Daniell. 2005. OBPC symposium: maize 2004 & beyond – Recent advances in chloroplast genetic engineering. *In vitro Cell. Develop. Biol. – Plant.* 41:388-404.
- LEISTER, D. 2003. Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet.* 19: 47-56
- PALMER, J.D. 1987. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *Am. Nat.* 130:S6-S29.
- RUIZ, G. 2002. Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of the human IGF-1 in transgenic chloroplasts. M.S. thesis, University of central Florida, Orlando.
- SAGER, R., and M. R. Ishida. 1963. Chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Biochemistry* 50: 725-730.
- SCOTT, S.E., and M. J. Wilkinson. 1999. Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*. *Nat. Biotechnol.* 17:390-392.
- SOUTHERN, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- SUGIURA, M. 1992. The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.* 19: 149- 168.
- TREGONING, J.S., P. Nixon, H. Kuroda, Z. Svab, S. Clare, F. Bowe, N. Fairweather, J. Ytterberg, K. Van Wijk, G. Dougan, and P. Maliga. 2003. Expression of tetanus toxin fragment C in Tobacco chloroplasts. *Nucleic Acid Res.* 31:1174-1179.
- TRIBOUSH, S.O., N.G. Daniilenko, and O.G. Davydenko. 1998. A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower. *Plant Mol. Biol.* 16: 183-189.
- VIRUPAKSHI, S., and G. Naik. 2007. Purification of DNA from chloroplast and mitochondria of sugarcane. *Curr. Sci.* 92: 1613-1619. 

Este artículo es citado así:

Hernández-Quezada, D. I., S. Arévalo-Gallegos, D. A. Betancourt-Guerra, A. Aguado-Santacruz, T. Siqueiros-Cendón, B. Rivera-Chavira, G. V. Nevárez-Moorillon y Q. Rascón-Cruz. 2011: *Método para la extracción de ADN cloroplastídico de *Bouteloua gracilis* como herramienta para aplicaciones moleculares.* *TECNOCIENCIA Chihuahua* 5(3): 132-139.

## Resúmenes curriculares de autor y coautores

**DAVID IGNACIO HERNÁNDEZ QUEZADA.** Terminó su licenciatura en el 2010, año en que le fue otorgado el título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Recibió el premio al modelo atómico en la FCQ 2006. Llevó a cabo la presentación de su trabajo de tesis en la semana de química del 2010. Asistente de investigación en la empresa INOVAK 2008.

**SIGIFREDO ARÉVALO GALLEGOS.** Estudio para Químico Bacteriólogo Parasitólogo Facultad de Ciencias Químicas de la UACH, realizó una Maestría en Ciencias (Biología Molecular), CINVESTAV-IPN, el Doctorado en Ciencias (Biología Molecular), CINVESTAV-IPN. Posdoctorado (Biología Molecular); Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, New York, N.Y. U.S.A. Actualmente labora en la Facultad de Ciencias Químicas de la UACH y posee la categoría de Académico titular C. Tiene 11 artículos publicados en revistas indexadas 25 memorias en extenso en revistas arbitradas, 14 artículos de divulgación, 4 capítulos en libro. Trabajos de investigación dirigidos: 8 Tesis de licenciatura, 13 de Maestría en Ciencias y uno de Doctorado en Ciencias. Proyectos de investigación con financiamiento externo: 7. Reconocimientos a trabajos de investigación dirigidos: 3 Internacionales; 3 Nacionales; 4 Estatales y 5 Locales.

**DAVID ADRIÁN BETANCOURT GUERRA.** Terminó su licenciatura en el 2004, año en que le fue otorgado el título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Realizó estudios de Maestría en Ciencias en Biotecnología finalizando en el 2007. Llevó a cabo un diagnóstico molecular de tuberculosis en 2008 en el Laboratorio Médico Especializado. En el medio académico desde el 2010 he impartido cátedra de Biología Forense, Biología Molecular y Genética Forense en el posgrado del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ). Es Perito en Genética forense en el Laboratorio de Genética Forense e Identificación Humana de la Dirección de Servicios Periciales en la Zona Norte desde 2006 a la fecha.

**GERARDO ARMANDO AGUADO SANTACRUZ.** Cursó la carrera de Biólogo con mención honorífica por parte de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, es Maestro en Botánica por el Colegio de Postgraduados y Doctor en Biotecnología por el CINVESTAV-Unidad Irapuato. Es investigador del INIFAP desde el año de 1986, donde actualmente se desempeña como Investigador Titular y Jefe del Laboratorio de Biotecnología Microbiana y Fisiología Molecular de Plantas en el Campo Experimental Bajío, en Celaya, Guanajuato. Miembro del SNI desde 1998, actualmente con nombramiento de Investigador Nacional Nivel II. Es autor de 55 publicaciones entre las que se incluyen 19 artículos en revistas de circulación internacional y 9 en revistas nacionales con arbitraje, 5 capítulos de libros. En el año de 2008, el Dr. Aguado Santacruz recibió el Premio de Innovación Tecnológica por parte del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato por el desarrollo de biofertilizantes bacterianos que ayudan a reducir las dosis de fertilización química en maíz de temporal.

**TANIA SIQUEIROS CENDÓN.** Terminó su licenciatura en 2002, recibiendo el título de Química Bacterióloga Parasitóloga con Mención Honorífica por la Facultad de Ciencias Químicas de la UACH. Obtuvo el grado de Maestra en Ciencias en Biotecnología también con mención Honorífica en el 2006. Desde el 2002 labora en la Facultad de Ciencias Químicas de la UACH como responsable del departamento de secuenciación y en 2010 se incorporó a la Facultad como Profesor de Tiempo Completo. En 2009 recibió por parte de Gobierno del Estado de Chihuahua el premio Chihuahua en la categoría de Ciencias Biológicas. Su área de especialidad es la Biología Molecular, Inmunología y Microbiología. Ha sido asesora de 6 tesis de Licenciatura y 10 Tesis de Maestría. Ha presentado varios trabajos de investigación a nivel Nacional e Internacional. Es autora de 4 artículos científicos, más de 15 ponencias en congresos, y 1 capítulo de libro científico.

**BLANCA RIVERA CHAVIRA.** Realizó estudios como Químico Bacteriólogo Parasitólogo 1983 y Realizó estudios de Doctorado en Biología Molecular en el CINVESTAV- Zacatenco, finalizando en 1989. Actualmente es profesor titular C en la Facultad de ciencias Químicas de la UACH desde 1991. Ha publicado 6 artículos en revistas indexadas, dos de divulgación y tiene capítulos de libro. Ha presentado más de 20 trabajos en congresos nacionales e internacionales. Ha graduado estudiantes de 6 de licenciatura y 6 de Maestría en Ciencias en Biotecnología. Es profesor titular en la Facultad de Ciencias Químicas de la UACH desde 1988 a la fecha.

**GUADALUPE VIRGINIA NEVÁREZ MOORILLÓN.** Cursó su licenciatura en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), recibiendo el título de Químico Biólogo Parasitólogo. Realizó estudios de doctorado en la University of North Texas con la tesis «Biodegradación de componentes de petróleo contaminantes en aguas y suelos por bacterias del suelo»; en 1995 se le otorgó el grado de Ph.D., especialidad Biología. Ha recibido más de siete distinciones y premios, incluyendo el Premio Nacional en Ciencia y Tecnología de Alimentos en la Categoría Profesional (2006). Perteneció al Sistema Nacional de Investigadores Nivel I. Desde 1995 ha sido maestra de la Facultad de Ciencias Químicas (UACH) y su productividad científica incluye más de treinta artículos en revistas arbitradas; ha editado más de cuatro libros y dirigido más de 60 tesis (licenciatura, maestría y doctorado). La Dra. Nevárez pertenece a diversas sociedades científicas, citándose entre algunas de ellas la American Society for Microbiology, la Society for Microbial Ecology y la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.

**QUINTÍN RASCÓN CRUZ.** Terminó su licenciatura en 1992, como Químico Bacteriólogo Parasitólogo por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH). Realizó estudios de posgrado como Maestro en Ciencias en Inmunología en UACH/FCQ y obtuvo el doctorado en Biotecnología de Plantas por el CINVESTAV Irapuato en 2003. Actualmente labora en la Facultad de Ciencias Químicas de la UACH y posee la categoría de Académico Titular C. Ha sido miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel I desde 2003. Su área de especialización es Biotecnología en plantas. Ha dirigido 11 tesis de licenciatura, 16 de maestría y 2 de doctorado. Es autor de aproximadamente 25 artículos científicos, más de 45 ponencias en congresos, y 2 capítulos de libros científicos; además ha recibido distinciones nacionales y estatales por sus trabajos de investigación (Premio Chihuahua 1997 y 2003), Premio Alfredo Sánchez Marroquín 2004) ha dirigido 5 proyectos de investigación financiados por fuentes externas. Es evaluador de proyectos de investigación del CONACYT (Fondos institucionales, mixtos y sectoriales) y Fundación Produce Chihuahua, es revisora del seguimiento de los Fondos sectoriales Sagarpa-Conacyt, y es coordinador del Consejo Consultivo Científico de la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados 2009-2011.

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

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

VÍCTOR MANUEL GUERRERO-PRIETO<sup>1,3,4</sup>, DAVID IGNACIO BERLANGA-REYES<sup>1</sup>,  
PAUL BARUK ZAMUDIO FLORES<sup>1</sup> Y ESTEBAN SÁNCHEZ-CHÁVEZ<sup>2</sup>

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 fungosas 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.

<sup>1</sup> 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.

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

<sup>3</sup> Dirección electrónica del autor de correspondencia: vguerrero@uach.mx.

<sup>4</sup> 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  $\beta$ -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\*<sup>2</sup> +b\*<sup>2</sup>). 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 Na<sub>2</sub>EDTA 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<sup>-1</sup> 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 (2.5)	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 <sup>-1</sup> 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 fitopatogenos 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.
- PROTSENKO, 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.

# El ácido giberélico incrementa la germinación prematura en el nogal pecanero (*Carya illinoensis* Koch.)

## Gibberellic acid increases premature germination in pecan (*Carya illinoensis* Koch.)

GERARDO MARTÍNEZ-DÍAZ<sup>1,2</sup>

Recibido: Junio 8, 2011

Aceptado: Octubre 22, 2011

### Resumen

La viviparidad o pregerminación en el nogal pecanero causa pérdidas de 40% en el cv Wichita y 25% en el cv Western en el noroeste de México y Arizona. Una hipótesis sugiere que las giberelinas y ácido abscísico regulan la viviparidad y la entrada a la dormancia en semillas de maíz, y que si el balance favorece a las giberelinas, entonces las semillas germinan en la planta. Los experimentos se llevaron a cabo en los años 2004, 2005, 2009 y 2010, en huertos de la Costa de Hermosillo, Sonora. El ácido giberélico se aplicó foliarmente en concentraciones de 360 y 720 ppm entre el estado de gel y llenado de la almendra. El porcentaje de germinación prematura varió de 3.7 a 46%, dependiendo del tratamiento y fecha de cosecha, donde este último factor fue el más importante. En tres de los cuatro años de evaluación hubo un incremento significativo de la germinación prematura con el tratamiento de GA<sub>3</sub>, especialmente en las cosechas tardías (p<0.05), mientras que los cuatro años hubo un retraso de la apertura del ruezno en este tratamiento. La concentración de GA<sub>3</sub> en el eje embrional de las nueces al momento de la cosecha fue de 14 a 19 ppm, siendo similar entre los tratamientos, lo que indicó que la viviparidad no fue inducida por un incremento de esta hormona en estos órganos, sino por el retraso en la apertura del ruezno, lo cual podría a su vez retrasar la deshidratación de las nueces, un proceso que se necesita para que éstas entren a la dormancia.

**Palabras clave:** viviparidad, Desierto de Sonora, apertura del ruezno, dormancia.

### Abstract

Vivipary or pregermination in pecan causes the loss of up to 40% in cv Wichita and 25% in cv Western in Northwestern Mexico and Arizona. An hypothesis suggests that gibberellins and abscisic acid regulate vivipary and entry into dormancy in seeds of corn and if the balance favors the gibberellins, then the seeds germinate on the plant. The experiments were carried out in the years 2004, 2005, 2009 and 2010 in orchards from La Costa de Hermosillo, Sonora. Gibberellic acid was foliar sprayed at concentrations of 360 and 720 ppm between the state of gel and nut filling. Premature germination ranged from from 3.7 to 46%, depending on the treatment and harvest date, where the latter was the most important factor. In three of the four years of evaluation, there was a significant increase in premature germination with GA<sub>3</sub> treatment, especially in late harvests (p<0.05), while in the four years there was a delay in opening of husk. GA<sub>3</sub> concentration in the embryo axis of the nuts at the time of harvest varied from 14 to 19 ppm and was similar among the treatments, indicating that vivipary was not induced by an increase of this hormone in these organs, but by the delay in opening of the husk, which might delay the dehydration of nuts, a process that is needed by this fruit to enter into dormancy.

**Keywords:** vivipary, Sonora Desert, opening of the husk, dormancy.

### Introducción

La viviparidad o germinación prematura de la nuez es uno de los problemas en las huertas nogaleras de las regiones cálidas, donde las pérdidas derivadas ascienden hasta en 40% en el cv Wichita y 25% en el cv Western (Núñez y Martínez, 2001; Lagarda-Murrieta, 2007). La viviparidad es la continuación del crecimiento de las semillas aún cuando están unidas a la planta; se conoce que ocurre en 78 familias de plantas que incluyen 143 géneros y 195 especies donde en el 50% de los casos es viviparidad verdadera, esto es, donde existe reproducción sexual (Farnsworth, 2000).

<sup>1</sup> Campo Experimental Costa de Hermosillo. Carr. a Bahía de Kino km. 12.6. Hermosillo, Son. Tel 662-261-0072.

<sup>2</sup> Dirección electrónica del autor de correspondencia: geraldmdz@yahoo.com.

Estudios conducidos en la Costa de Hermosillo indican que la capacidad de germinar prematuramente existe en la mayoría de las nueces del cv Wichita y en menor capacidad en las del cv Western, y que la iniciación de la viviparidad ocurrió una semana antes de detectarse la presencia de raíces fuera de la cáscara de la nuez, pero no se encontró cuándo ocurre la inducción de este proceso (Martínez-Díaz *et al.*, 2003, 2004, 2005). En el maíz, cultivo que presenta viviparidad, se encontró que la inducción ocurrió desde cinco a siete días después de la polinización (Fong *et al.*, 1983).

La inducción de la viviparidad puede entenderse como un proceso inverso a la inducción de la latencia. Se conoce que ésta última está influenciada por factores internos de la planta, como la condición hormonal o carga energética (Taylorson y Hendricks, 1984). Esto contrasta con la quiescencia, que es causada por factores externos como anoxia y sequía.

En el maíz se ha encontrado que mutantes deficientes en la biosíntesis de ABA o insensibles al ABA presentan viviparidad (Robichaud *et al.*, 1980; Durantini *et al.*, 2008). Normalmente, el ABA se concentra en la fase tardía de la embriogénesis en las semillas y después declina al desecarse el embrión, por lo cual se le asocia con la entrada de las semillas a la latencia. Sin embargo, en el mangle (*Rhizophora mangle*), cuyas semillas presentan viviparidad, los mecanismos de la biosíntesis del ABA son funcionales durante el desarrollo del embrión pero las concentraciones de esa hormona no alcanzan su mayor concentración en los tejidos en la fase tardía de la embriogénesis, lo cual sugiere que existen otros mecanismos para la regulación de la viviparidad (Ismail *et al.*, 2004).

Estudios recientes demostraron que es el balance entre giberelinas y ácido abscísico el que puede regular la viviparidad en las semillas de maíz, ya que en las semillas deficientes de ABA la reducción de giberelinas resultó en una disminución de la viviparidad (White *et al.*, 2000). No obstante, la aplicación foliar de

trinexapac-etil (125 a 1000 ppm) y paclobutrazol (62 a 125 ppm), inhibidores de la biosíntesis de giberelinas, en dosis de 12 a 250 ppm no redujeron la viviparidad del nogal pecanero (Martínez-Díaz, 2008).

La interacción de diferentes genes que regulan a la entrada de la dormancia en las semillas, según los resultados de estudios en genética molecular en *Arabidopsis*, sugiere que se requiere de una red de información hormonal en la regulación de ese proceso (Brady y McCourt, 2003). Si es el balance de giberelinas/ácido abscísico el que determina la viviparidad en el nogal, entonces las aplicaciones de ácido giberélico podrían aumentar esa relación y por lo tanto incrementar la viviparidad de la nuez. El objetivo de este trabajo fue determinar si aplicaciones de ácido giberélico incrementan la viviparidad en el nogal pecanero.

## Materiales y métodos

Los experimentos se llevaron a cabo en un huerto de nogal del Campo Experimental de la Costa de Hermosillo en el año 2004, en un huerto del ejido El Triunfo en el 2005 y en el Campo La Perseverancia en los años 2009 y 2010. Los huertos del Campo Experimental y de La Perseverancia tuvieron irrigación por goteo con manguera enterrada, mientras que en el ejido El Triunfo se practicó riego rodado. Las tres huertas tienen a las variedades Western y Wichita, pero las evaluaciones solo se realizaron en la variedad Wichita, la cual presenta los mayores porcentajes de germinación prematura. Los cambios en los huertos a través de los años de estudio se realizaron debido a que en los años de baja carga se seleccionaron los sitios con árboles que tenían nueces para realizar la evaluación.

En el 2004 los tratamientos fueron: 1) Tres aplicaciones de ácido giberélico en dosis de 360 ppm y 2) Testigo sin aplicación. La dosis de ácido giberélico utilizada es superior a la requerida para detectar respuesta arbustos y nogal, la cual es de 100 ppm (Thompson, 1992) a 346 ppm (Zertuche, 1991). Las aplicaciones

se realizaron el 27 de agosto, el 6 de septiembre y el 17 de septiembre del 2004. El diseño experimental fue de parcelas apareadas, la unidad experimental fue una sección de un árbol localizada en la parte norte o en la parte sur y se tuvieron siete repeticiones por tratamiento. En el 2005 se tuvieron tres tratamientos: 1) Una aplicación de GA<sub>3</sub> al inicio de la etapa de llenado de almendra en dosis de 360 ppm, 2) Tres aplicaciones de GA<sub>3</sub>, en dosis de 360 ppm, una al inicio de la etapa de llenado de almendra, otra en la fase intermedia y otra al final de la etapa de llenado de almendra, y 3) Testigo sin aplicación. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño totalmente al azar, la unidad experimental fue la rama de un árbol y se tuvieron cuatro repeticiones. Las fechas de aplicación fueron, para el inicio de la etapa de llenado de almendra, el 25 de agosto del 2005, para la fase intermedia el 9 de septiembre y para la etapa final de llenado de almendra, el 20 de septiembre del 2005. En el 2004 y 2005 las aplicaciones se realizaron con una aspersora manual equipada con boquillas de abanico mojando el follaje y racimos de nuez hasta escurrimiento. En el 2004 se dieron cuatro cosechas, del 12 de octubre al 2 de noviembre; en estas se cosecharon solo las nueces con ruezno suelto de la cáscara, en las cuales se determinó la cantidad de nueces germinadas y las nueces con ruezno adherido a la cáscara no fueron consideradas. En el año 2005 la cosecha se realizó el 14 de octubre, donde se evaluaron las nueces totales, nueces con el ruezno separado de la cáscara y nueces germinadas en cada una de las ramas. En el año 2009 los tratamientos fueron: 1) Una aplicación de GA<sub>3</sub> en dosis de 360 ppm y 2) Testigo sin aplicación. Se realizó solo una aplicación el 17 de septiembre con una aspersora de alta presión para asperjar todo el árbol con 20 litros de la solución. La unidad experimental fue un árbol y se tuvieron cinco repeticiones. El diseño experimental fue de parcelas apareadas. Se realizaron tres cosechas, en cada una de las cuales los árboles se cosecharon mecánicamente utilizando una

máquina vibradora durante dos minutos, y la evaluación se realizó en ocho segmentos tipo rebanada de pastel en cada árbol que en total suman 1/12.5 del área total donde cae la nuez cosechada. Las cosechas se realizaron el 5, 19 y 30 de octubre. Las nueces con ruezno suelto de la cáscara se separaron en germinadas y no germinadas, donde de estas últimas se tomó un kilogramo para cuantificar variables de calidad de la nuez. Al mismo tiempo se realizó un recuento de nueces con ruezno verde pegado a la cáscara y nueces con ruezno necrótico. Del grupo de nueces no germinadas con el ruezno separado de la cáscara se tomó la muestra de un kilogramo para medir variables de calidad de la nuez.

En el año 2010 los tratamientos fueron: 1) Una aplicación de GA<sub>3</sub> en dosis de 320 ppm, 2) Una aplicación de GA<sub>3</sub> en dosis de 720 ppm y 3) Testigo sin aplicación. Las aplicaciones se realizaron el 9 de septiembre del 2010. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar, la unidad experimental fue un árbol y se tuvieron seis repeticiones. Se realizaron dos cosechas, la primera el 22 de octubre y la segunda el 22 de noviembre, durante las cuales los árboles se vibraron y la evaluación se realizó en ocho segmentos tipo rebanada de pastel en cada árbol. Las nueces con ruezno suelto de la cáscara se separaron en germinadas y no germinadas, donde de estas últimas se tomó un kilogramo para medir variables de calidad de la nuez. Al mismo tiempo, se realizó un recuento de nueces con ruezno verde adherido a la cáscara y nueces con ruezno necrótico. Del grupo de nueces no germinadas con el ruezno separado de la cáscara se tomó la muestra de un kilogramo para medir variables de calidad de la nuez. También se tomó una muestra de nueces con ruezno verde adherido a la cáscara con el fin de evaluar la cantidad de nueces germinadas y su llenado. Adicionalmente, el 22 de noviembre se colectaron tres muestras de nueces no germinadas con ruezno suelto en cada tratamiento, de donde se obtuvo el eje embrional



para analizar la concentración de GA<sub>3</sub> en sus tejidos utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta presión. El análisis se realizó en laboratorios del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora, utilizando 10 g de tejido vegetal liofilizado y molido siguiendo la técnica descrita por Kelen *et al.* (2004), utilizando un equipo HPLC VARIAN LC Polaris acoplado a un detector UV-VIS Prostar, una columna C18 (Supelcosil) y una fase móvil de metanol acidificado.

Los datos de los experimentos se sometieron a un análisis de varianza y se realizó una comparación de medias mediante la Prueba de Duncan al 0.05% en los experimentos con el diseño completamente al azar y una prueba DMS al 0.05 en los experimentos donde se utilizó el diseño de parcelas apareadas (Steel and Torrie, 1980).

## Resultados y discusión

En el 2004 se encontró que el porcentaje de nueces germinadas en las nueces con ruezno separado de la cáscara fue similar bajo los dos tratamientos, e indicaron una ausencia de respuesta al GA<sub>3</sub>, ya que la germinación fue de 35% en el testigo y 34% en bajo el tratamiento con GA<sub>3</sub> (Cuadro 1). Tampoco se encontró diferencia en el porcentaje de nueces con inicio de germinación (pregerminadas) ni en el peso de los cotiledones de las nueces remanentes. El ácido giberélico retardó la apertura del ruezno, ya que las primeras nueces con el ruezno separado de la cáscara se observaron el 26 de octubre, mientras que en el testigo se observaron desde el 12 de octubre del 2004. (Datos no presentados).

**Cuadro 1.** Efecto del ácido giberélico en dosis de 360 ppm en la germinación de la nuez cv Wichita. 2004.

Fechas de aplicación	Nueces con ruezno separado de la cáscara		Peso cotiledones (g)*
	Germinadas (%)*	Pregerminadas (%)*	
Testigo	35.7 a	2.3 a	5.11 a
27 Ago, 6 Sep, 17 Sep	34.1 a	0 a	5.11 a

\*Medias con la misma letra no significativamente diferentes (DMS=0.05).

En la evaluación conducida en el 2005, se encontró un incremento de la germinación prematura al aplicar durante tres ocasiones el GA<sub>3</sub> no así al aplicar solo una vez, al inicio del llenado de la nuez (Cuadro 2). En el 2005 se detectó que el ruezno permaneció adherido por más tiempo al aplicar esta hormona, como se puede notar en el porcentaje de nueces con ruezno adherido a la cáscara. Esta característica también se observó en el 2004, aunque no se midió su intensidad. En el 2005 tampoco se observó efecto alguno en el peso de los cotiledones al aplicar el GA<sub>3</sub>.

**Cuadro 2.** Efecto de la aplicación ácido giberélico en dosis de 360 ppm en la nuez cv Wichita (14 de octubre del 2005).

Tratamientos	Nueces con ruezno separado de la cáscara germinadas %	Nueces con ruezno verde adherido a la cáscara %	Peso cotiledones (g)*
Una aplicación	25 ab	12 ab	5.7 a
Tres aplicaciones	35 a	16 a	5.9 a
Testigo	19 b	6.3 b	5.8 a

\*\* Medias con la misma letra no significativamente diferentes según la Prueba de Duncan al 0.05.

En el año 2009 se efectuaron tres cosechas y se encontró que la germinación prematura fue más alta bajo los tratamientos con ácido giberélico que en los árboles utilizados como testigo en la tercera fecha de cosecha realizada el 30 de octubre (p<0.05), pero no en las primeras dos cosechas (Cuadro 3). El porcentaje de nueces con el ruezno verde adherido a la cáscara fue más alto en los tratamientos con ácido giberélico que en el testigo en la primera fecha de evaluación realizada el 5 de octubre (p<0.05), pero no en las cosechas subsiguientes, indicando un retraso la separación del ruezno, tal como se había notado en los años precedentes (Cuadro 3). Esta cantidad fue extremadamente alta en la primera cosecha y significó el 31.8% del total de las nueces observadas en los árboles tratados con GA<sub>3</sub>. En las dos cosechas siguientes el porcentaje de nueces con ruezno verde adherido a la cáscara declinó y fue similar al testigo. El porcentaje de nueces con

ruezo necrótico adherido a la cáscara fue estadísticamente similar al testigo en las tres cosechas, aunque hubo la tendencia a mostrar valores más altos en la cosecha del 5 de octubre. Al igual que en los años 2004 y 2005, no se detectó algún cambio en el crecimiento de los cotiledones, en este caso expresado como porcentaje de almendra, ni en el porcentaje de nueces pregerminadas (Cuadro 4).

**Cuadro 3.** Efecto del GA<sub>3</sub> en dosis de 360 ppm en la viviparidad y otras características de la nuez cv Wichita. 2009.

Característica de la nuez %	Tratamiento	Fecha de cosecha		
		5 de octubre	19 de octubre	30 de octubre
Nueces con ruego separado de la cáscara germinadas	GA <sub>3</sub>	3.7 a	11.8 a	25.9 a
	Testigo	4.3 a	4.9 b	8.8 b
Con ruego verde adherido a la cáscara	GA <sub>3</sub>	31.8 a	3.8 a	1.6 a
	Testigo	4.2 b	2.8 a	2.8 a
Con ruego necrótico adherido a la cáscara	GA <sub>3</sub>	9.3 a	3.8 a	0.4 a
	Testigo	4.2 a	1.8 a	0.1 a

\*Medias con la misma letra no significativamente diferentes (DMS=0.05).

**Cuadro 4.** Efecto del GA<sub>3</sub> en dosis de 360 ppm en el llenado de almendra y pregerminación en nueces con ruego separado de la cáscara. 2009.

Tratamiento	Porcentaje de nuez comestible	Nuez pregerminada %
GA <sub>3</sub>	54.7 a	4.7 a
Testigo	57.0 a	2.1 a

\*\*Medias con la misma letra no significativamente diferentes (DMS=0.05).

En el año 2010 no se detectaron diferencias en la germinación prematura entre los tratamientos, en las dos cosechas realizadas. En la cosecha del 22 de octubre, el porcentaje de nueces con ruego verde adherido a la cáscara aumentó al incrementarse la concentración de GA<sub>3</sub> y fue estadísticamente diferente al tratamiento con la dosis 720 ppm y el testigo (p<0.05); mientras que en la cosecha del 22 de noviembre no hubo diferencias entre los tratamientos. En la primera cosecha también se detectó que el porcentaje de nueces con ruego necrótico adherido a la cáscara aumentó al aplicar GA<sub>3</sub>, pero no hubo diferencia en esta variable en la segunda cosecha (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Efecto del GA<sub>3</sub> en la viviparidad y otras características de la nuez cv Wichita. 2010.

Dosis de GA <sub>3</sub>	Característica de la nuez					
	Nueces con ruego separado de la cáscara germinadas (%)		Nueces con ruego verde adherido a la cáscara (%)		Nueces con ruego necrótico adherido a la cáscara (%)	
	22/10/10	22/11/2010	22/10/10	22/11/2010	22/10/10	22/11/2010
0	26 a	39 a	5.3 a	3.8 a	1.3 a	1.5 a
360 ppm	31 a	46 a	9.8 ab	3.6 a	4.0 ab	2.3 a
720 ppm	18 a	44 a	18.5 b	6.0 a	5.1 b	1.4 a

Medias con la misma letra no significativamente diferentes según la Prueba de Duncan al 0.05.

Cuando se observaron solo las nueces con el ruego adherido a la cáscara se encontró que el porcentaje de nueces germinadas fue superior cuando se aplicó ácido giberélico, y se observó una tendencia a encontrar más nueces llenas bajo esos tratamientos (Cuadro 6). En las nueces con

ruego separado de la cáscara el llenado de la nuez y el porcentaje de nueces pregerminadas fue similar. Al igual que en los años 2004 y 2005 el llenado de las nueces no fue alterado por las aplicaciones de ácido giberélico.

**Cuadro 6.** Efecto del GA<sub>3</sub> en la viviparidad de nueces con ruezno adherido a la cáscara y llenado en las nueces con ruezno separado de la cáscara en el cv Wichita. 2010.

Dosis de GA <sub>3</sub>	Nueces con ruezno verde adherido a la cáscara		Nueces con ruezno separado de la cáscara	
	Germinadas (%)	Sin llenar (%)	Llenado de nuez (%)	Pregerminadas (%)
0	5.9 a	61 a	49.7 a	11.2 a
360 ppm	27.4 b	37 a	51.2 a	7.5 a
720 ppm	11.9 ab	32 a	52.9 a	5.6 a

Medias con la misma letra no significativamente diferentes según la Prueba de Duncan al 0.05.

El análisis del contenido de ácido giberélico en el eje embrional no mostró diferencia alguna en la concentración entre nueces tratadas con esa hormona bajo los diferentes tratamientos (Cuadro 7). La movilidad del ácido giberélico ha sido documentada y se conoce que se transloca de las hojas a los ápices y otros sitios de demanda. En ese caso, las aplicaciones de AG<sub>3</sub> se realizaron a todo el árbol en el momento de llenado de la nuez, por lo que se esperaba encontrar mayores concentraciones en el eje embrional, órganos que se desarrollan cuando existe viviparidad. El eje embrional ya tiene los tejidos de conducción por donde puede moverse el AG<sub>3</sub>. Sin embargo, el estado de desarrollo de estos tejidos así como su comunicación con el tejido vascular de las ramas y cotiledones puede ser muy precario, por lo que esta hormona no alcanza a moverse hacia esos tejidos.

**Cuadro 7.** Contenido de ácido giberélico en el eje embrional (radícula + epicotilo) de nuez bajo diferentes tratamientos de AG<sub>3</sub>. 2010.

Dosis de ácido giberélico (ppm)	AG <sub>3</sub> en eje embrional (µg/gps)
0	14 a
360	19 a
720	18 a

\* Medias con la misma letra no significativamente diferentes según la Prueba de Duncan al 0.05.

Los resultados de los cuatro años de experimentación, ya sea a nivel de ramas de árboles o de árboles, indican que el AG<sub>3</sub> retrasó la apertura del ruezno. La apertura del ruezno en nogal es inducida por etileno (Wood, 1986), y por lo tanto su inhibición por la aplicación de ácido giberélico es de esperarse, ya que se conoce que entre estas dos hormonas existen efectos antagónicos (Shechter *et al.*, 1989).

En tres de los cuatro años de investigación se observó un incremento de la germinación prematura en las nueces con la aplicación de ácido giberélico, especialmente en la fase tardía de cosecha. Los resultados indican que, en efecto, esta hormona induce la viviparidad en nogal pecanero, como lo indicó Zertuche (1991). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la concentración de AG<sub>3</sub> en el eje embrional entre el testigo y árboles aplicados con esa hormona.

Los resultados anteriores indican que las aplicaciones de ácido giberélico pueden aumentar la germinación prematura de la nuez debido a efectos indirectos, al retrasar la apertura del ruezno y no a un cambio en la concentración de AG<sub>3</sub> en el eje embrional. Este retraso en la apertura del ruezno puede llevar a la vez a un retraso en la deshidratación de las nueces e inducir la viviparidad, como lo indican Goldberg *et al.* (1994). En efecto, estos autores mencionan que la deshidratación de las semillas en la fase tardía de la embriogénesis es necesaria para que éstas entren en dormancia.

Las aplicaciones de ácido giberélico no mostraron un incremento de esa hormona en los tejidos, a pesar de que ésta tiene movilidad tanto por xilema como por floema (Smith, 1993). Lo anterior podría indicar que si bien el ácido giberélico se transloca por estos tejidos, su movilidad depende de la fuerza con la que los órganos la demandan. Es posible que durante la maduración de la nuez, el eje embrional no ejerza una fuerte demanda esta hormona, por lo que no se moviliza hacia esos tejidos. Otra posibilidad es que los tejidos de conducción en el eje embrional no estén lo suficientemente

desarrollados para facilitar la movilidad de esta hormona. Finalmente, también es posible que el tipo de giberelina que provoca la viviparidad en el nogal pecanero sea diferente a AG<sub>3</sub>. Es conocido que existe una gama de moléculas de este grupo y que algunas son muy específicas en su acción (Richards *et al.*, 2001).

El incremento en la germinación de la nuez aparentemente no está ligado a un aumento en la concentración de AG<sub>3</sub> en el eje embrional de la nuez; sin embargo, está asociado a un retraso en la apertura del ruezno. Trabajos previos han indicado que una estimulación en la apertura del ruezno reduce la germinación prematura de la nuez (Wood, 1986; Lagarda-Murrieta, 2007). La apertura del ruezno puede estar asociada a una más rápida deshidratación del embrión, que como ha sido documentado, es un prerrequisito para que las semillas entren en dormancia (Goldberg *et al.*, 1994).

El conjunto de resultados de estos experimentos sugieren que es necesario estudiar los factores de manejo que inciden en la apertura del ruezno, ya que este parece ser la mayor limitante en la deshidratación de las nueces, lo que favorece la germinación prematura de la nuez.

El ácido giberélico no presentó una mejora o un deterioro en la calidad de la nuez con el ruezno separado de la cáscara, ya que los parámetros medidos no indicaron un cambio en el peso de la almendra o en la pregerminación. El ácido giberélico se conoce que induce aumento de tamaño en una diversidad de frutos debido a un aumento en el tamaño de las células. En contraste, en la semillas no parece tener una influencia en el tamaño, aún cuando se conoce que juega un papel importante en la germinación, una vez que las semillas han terminado su dormancia (Richards *et al.*, 2001).


## Conclusiones

El ácido giberélico retrasó la apertura del ruezno de la nuez, lo que provocó un incremento de la viviparidad en las cosechas tardías. Este aumento de la viviparidad no estuvo asociado a

un incremento de la concentración de ácido giberélico en los tejidos del eje embrional, por lo que más bien se asocia a un retraso en la deshidratación, proceso que es importante en la fase tardía de la embriogénesis para que las semillas entren en dormancia.

## Literatura citada

- BRADY, S.M. and P. McCourt. 2003. Hormone cross-talk in seed dormancy. *J. Plant Growth Regul.* 22:25-31.
- DURANTINI, D., A. Giuliani, A. Malgioglio, R. Pílu, R. Tuberosa, C. Sanguineti, and G. Gavazzi. 2008. Vivipary as a tool to analyze late embryogenic events in maize. *Heredity* 101: 465-470.
- FARNSWORTH, E. 2000. The ecology and physiology of viviparous recalcitrant seeds. *Ann. Rev. Ecol. System.* 31:107-138.
- FONG, F., J.D. Smith, and D.E. Koehler. 1983. Early events in maize seed development. 1-methyl-3-phenyl-5-(3(trifluoromethyl)phenyl)-4-(1H)-pyridinone induction of vivipary. *Plant Physiol.* 73:899-901.
- GOLDBERG, R.B., G. Paiva, and R. Yadegari. 1994. Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science.* 266:605-614.
- ISMAIL, F., L. Nitsch, C. Mariano, J. Derksen, M. Wolters, and R. Vander-Gaag. 2004. Synthesis and localization of ABA in viviparous mangrove embryos. 3<sup>rd</sup> International symposium on plant dormancy. From molecular level to the whole plant. Waneningen International Conference Center. Waneningen. The Netherlands. pp:35.
- KELEN, M., E. Cubuk, S. Sen y G. Ozkan. 2004. Separation of abscisic acid, índole-3-acetic acid, gibbellelic acid in 99R (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) and rose oil (*Rosa damascena* Mill.) by reversed phase liquid chromatography. *T.J. Chem.* 28:603-610.
- LAGARDA-MURRIETA, A. 2007. La germinación prematura de la nuez pecanera (viviparidad). Memoria del Seminario de nogal pecanero 2007. Hermosillo, Son. Pp:9-17.
- MARTÍNEZ-DÍAZ, G. y J.H. Núñez. 2003. Ontogenia y viviparidad de la nuez en la Costa de Hermosillo, Son. Seminario del Nogal Pecanero. Memoria Técnica No. 10. CECH-CIRNO-INIFAP. pp:69-76.
- MARTÍNEZ-DÍAZ, G., J.H. Núñez y A. Márquez. 2004. Ontogenia de la nuez pecanera en la Costa de Hermosillo, Son. VII Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas. Mexicali B.C. pp:492-495.
- MARTÍNEZ-DÍAZ, G., J.H. Núñez y A. Márquez. 2005. El crecimiento de la nuez y de su eje embrional durante la germinación prematura. VIII Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas. Mexicali B.C. pp:276-282.
- MARTÍNEZ-DÍAZ, G. 2008. Efecto de inhibidores de la biosíntesis de giberelinas en la viviparidad del nogal pecanero (*Carya illinoensis* Koch.). *Biotechnia* 10(3):30-37.
- NÚÑEZ, J. H. y Martínez D., G. 2001. Manejo integrado de plagas, enfermedades y maleza. In: El nogal pecanero en Sonora. CECH-CIRNO-INIFAP. pp: 123-174.
- RICHARDS, D.E., K. E. King, T. Ait-ali, and N.P. Harberd. 2001. How gibberellins regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellins signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:67-88.
- ROBICHAUD, C.S., J. Wong, and I. Sussex. 1980. Control of in vitro growth of viviparous embryo mutants of maize by abscisic acid. *Devel. Genet.* 1:325-330.

- SHECHTER, S., E.E. Goldschmidt, and D. Galili. 1989. Persistence of [<sup>14</sup>C] gibberellins A<sub>3</sub> and [<sup>3</sup>H] gibberellins A<sub>1</sub> in senescing, ethylene treated citrus and tomato fruit. *Plant Growth Regulation* 8:243-253.
- SMITH, V.A. 1993. Gibberellin translocation in *Pisum sativum* L. III Biological and biochemical consequences in the le mutation. *Planta* 91(2):158-165.
- STEEL, R.G. and J.H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics, a biometrical approach. McGraw-Hill Kogakusha, LTD. 633 p.
- TAYLORSON, R.B. and S.B. Hendricks. 1984. Dormancy in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28:350-356.
- THOMPSON, W.T. 1992. Agricultural Chemicals. Book III. Miscellaneous agricultural chemicals. Thompson Publications. Fresno CA. 206 p.
- WHITE, C.N., W.M. Proebsting, P. Hedden, and C.J. Rivin. 2000. Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathway. *Plant Physiol.* 122:1081-1088.
- WOOD, B.W. 1986. Use of ethephon and NAA for inducing early shuck dehiscence of pecan. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111:533-537.
- ZERTUCHE, M. 1991. Determinación del tiempo de inducción y la influencia de las giberlinas en la viviparidad de semillas de nogal pecanero. IV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de las Ciencias Hortícolas. UAAAN. Saltillo. Coah. p:382. 

---

Este artículo es citado así:

Martínez-Díaz, G. 2011. *El ácido giberélico incrementa la germinación prematura en el nogal pecanero (Carya illinoensis Koch.). TECNOCENCIA Chihuahua* 5(3): 148-155.

## Resumen curricular del autor

**GERARDO MARTÍNEZ-DÍAZ.** Terminó su licenciatura en 1982, año en que le fue otorgado el título de Ingeniero agrónomo parasitólogo por el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH). Realizó su Maestría en Ciencias en el Colegio de Postgraduados en Montecillos, México, donde obtuvo el grado de Maestro en Ciencias en Botánica en 1989 y el grado de Doctor en Filosofía en Ciencias de las Plantas en 1997 por la Universidad de Arizona, Estados Unidos. Desde 1984 labora en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias y posee la categoría de Investigador titular C. Ha sido miembro del Sistema Nacional de Investigadores (candidato 1989-1994). Su área de especialización es Fisiología vegetal. Ha dirigido 2 tesis de licenciatura y 2 de maestría. Es autor de aproximadamente 7 artículos científicos, más de 100 ponencias en congresos, 3 libros, 5 folletos técnicos, 3 capítulos de libros técnicos; ha dirigido 9 proyectos de investigación financiados por fuentes externas. Es miembro de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas, Sociedad Mexicana de la Ciencia de la Maleza, Sociedad Mexicana de Fitogenética y la American Society of Enology and Viticulture e impartido cursos de Fisiología vegetal, Anatomía vegetal y Producción de Cultivos en la Universidad de Sonora a nivel licenciatura y Maestría en Ciencias.

# Efectos por salinidad en el desarrollo vegetativo

## Effects of salinity on vegetative growth

NALLELY MARTÍNEZ VILLAVICENCIO<sup>1</sup>, CARLOS V LÓPEZ ALONZO<sup>1</sup>,  
MOISÉS BASURTO SOTELO<sup>1</sup>, RAMONA PÉREZ LEAL<sup>1,2</sup>

Recibido: **Mayo 30, 2010**

Aceptado: **Agosto 26, 2011**

### Resumen

El objetivo de esta revisión es dar a conocer la problemática que genera el estrés salino en diversos cultivos tales como trigo, pimiento, tomate, melón, brócoli, fresa y chile ancho, ya que esta dificultad no sólo aqueja al sector agropecuario, sino a toda la humanidad, puesto que los efectos se ven reflejados en muchos de los alimentos que el hombre consume. La salinidad es uno de los factores abióticos que limitan la productividad agrícola en México, en donde, de 29.3 millones de hectáreas que son utilizadas para esta actividad, 500,000 son improductivas debido a la alta concentración de sales que poseen. Los efectos van desde necrosis foliar, reducción de crecimiento del cultivo, pérdida de capacidad de germinación, afección en la producción de etileno, disminución de peso del fruto, entre otros.

**Palabras clave:** estrés salino, alimentos, productividad.

### Abstract

The objective of this review is to present the problems generated by salt stress in various crops such as wheat, pepper, tomato, melon, broccoli, strawberries and chile ancho, as this difficulty is not only afflicting the agricultural sector, but all humanity, since the effects are reflected in many of the food that man consumes. Salinity is one of the abiotic factors that limit agricultural productivity in Mexico, where, from 29.3 million hectares are used for this activity, 500,000 are unproductive due to high salt concentration they have. The effects range from leaf necrosis, reduced crop growth, loss of germination capacity, condition in ethylene production, fruit weight reduction, among others.

**Keywords:** salt stress, food, productivity.

## Introducción

Existen diversos tipos de estrés ambiental, los cuales afectan los cultivos que son el sustento alimenticio del hombre. La sequía, salinidad y temperaturas extremas son los principales tipos de estrés que causan efectos adversos en el crecimiento y productividad de los cultivos. La sequía es mayor en las regiones secas y calientes, en donde la concentración de sales se incrementa en la capa superior del suelo debido a la evapotranspiración, que excede a la precipitación (Oliva *et al.*, 2008). El incremento de los suelos salinos en todo el mundo limita la producción de cultivos para la alimentación humana y animal, estas áreas se consideran marginales, en un mundo donde el espacio y la alimentación constituyen grandes limitaciones (Mesa, 2003).

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Campus 1. Chihuahua, Chihuahua, México, 31310. Tel (614) 4391844 y 45.

<sup>2</sup> Dirección electrónica del autor de correspondencia: rpleal@uach.mx

En México, la distribución y extensión de suelos con problemas de sales se está incrementando en áreas de riego de las zonas áridas; de forma simultánea, la calidad del agua de riego en estas áreas es deteriorada progresivamente debido al exceso de sales; aunado a esto, cuando existe un mal manejo del agua y del suelo, desatendiendo los factores promotores de acumulación de sales, el proceso de salinización de los suelos se acelera y agrava (Zamudio-González *et al.*, 2004). Esto trae como consecuencia un deterioro progresivo de los suelos por salinización, lo cual repercute en una disminución de la productividad de rendimiento y de la calidad de las cosechas (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2002; Carter, 2002). El objetivo principal de esta revisión es documentar el impacto que genera el estrés salino en diversos cultivos, mostrando una revisión de la diversidad de daños que genera este tipo de estrés.

**Salinidad.** La salinidad del suelo es un problema que se incrementa año con año en las regiones áridas y semiáridas del mundo como consecuencia de una baja precipitación y un mal manejo del agua de riego y los fertilizantes (Villa *et al.*, 2006). La salinidad y la sequía son dos de los factores limitativos ambientales que afectan el establecimiento y desarrollo de las especies, así como la producción agrícola (Madueño-Molina *et al.*, 2006).

El problema afecta aproximadamente al 25% de los 230 millones de hectáreas irrigadas del planeta (Meloni *et al.*, 2008). En México, 29.3 millones de hectáreas son utilizadas para actividad agrícola, de las cuales 500,000 son improductivas debido a la alta concentración de sales que poseen (Partida-Ruvalcaba *et al.*, 2006). Para el 2007 en México se agravó este problema, aumentando el área afectada irrigada a 10%, y de ésta, el 64% se localiza en la parte norte del país (Cerdeña *et al.*, 2004), que corresponde al clima de zonas áridas y semiáridas donde el problema se agudiza a causa de que el agua es limitada (Ramírez-Serrano *et al.*, 2008).

Sin embargo, la salinidad no es un problema nuevo, ya que Meza (2007) lo señala como uno de los problemas ambientales más antiguos de la humanidad, que limita la distribución de las plantas en la naturaleza y la productividad de los cultivos. Por tanto, se requiere desarrollar prácticas de manejo para minimizar los efectos adversos de la salinidad en la producción agrícola; esto a su vez requiere entender los mecanismos que determinan la respuesta de la planta a la salinidad (Villa *et al.*, 2006).

**Efecto de sales en suelo.** Los suelos salinos presentan conductividad eléctrica de 4 ó más  $\text{dS m}^{-1}$ , un pH de 7.3 a 8.5 y menos de 15% de sodio intercambiable, que hacen que el crecimiento y desarrollo de plantas no sean remunerativos o que determinan las posibilidades de remoción de sus sales o sodio intercambiable, mediante prácticas correctivas.

La acumulación de sales implica diversas cuestiones que dan origen a ello, incitando así al establecimiento de solutos en determinado suelo. En general, las características del clima y del suelo y la calidad química del agua de riego, son las que determinan el proceso de salinización de los suelos en una región (Santamaría-César *et al.*, 2004).

Aunque la fuente original de sales proviene de los minerales primarios que forman las rocas, las sales solubles en el suelo provienen, en su mayoría, de las sales disueltas en el agua de riego. Si la precipitación es muy baja (menor que 380 mm anuales), las sales solubles se quedan en el suelo y, al evaporarse el agua, las sales del agua del suelo ascienden por capilaridad a la superficie del suelo y, después de muchos años, se forman los suelos salinos. Este proceso se presenta con frecuencia en zonas agrícolas de riego en condiciones de clima árido y semiárido (Santamaría-César *et al.*, 2004). En México, aproximadamente el 60% del territorio está conformado por zonas áridas (Rivera *et al.*, 2004).

Los suelos se vuelven improductivos debido a la elevada concentración de sales que poseen, lo cual se hace evidente cuando dicha

concentración aumenta después de un límite óptimo y comienzan a producirse los efectos salinos, toda vez que aumenta la presión osmótica en la solución del suelo en relación con la que existe en las células de las raíces de los cultivos, afectando la entrada de iones nutritivos en los pelos radiculares y, en consecuencia, la nutrición de las plantas. La presencia de sal en concentraciones elevadas en el suelo es un factor de estrés común e importante en los desiertos, pero también limita el crecimiento de plantas en muchas regiones templadas, ocasionando, incluso, la muerte de éstas (Partida-Ruvalcaba *et al.*, 2006).

El Na, al ser un elemento altamente higroscópico, atrapa las moléculas del agua del suelo, lo que provoca que disminuya el agua de hidratación para otros nutrimentos, afectando también la estructura del suelo al disgregar sus partículas. En los suelos salinos se reduce la absorción y traslocación de K y Ca, estos elementos son requeridos en el suelo para mantener la selectividad y la integridad de la membrana celular de la raíz. Las sales sódicas, en particular el NaCl, provocan un mayor castigo salino que otras sales y es una de las más comunes en las zonas agrícolas (Madueño-Molina *et al.*, 2006).

Por otra parte, la ineficiente economía del agua en las plantas cultivadas en condiciones salinas ocurre por la aparición de un estado de sequía fisiológica, que no se debe a la falta de agua en el suelo, sino a que la planta no puede absorberla con facilidad porque el suelo posee una alta concentración de sales y, por tanto, valores del potencial hídrico tan bajos que pueden llegar a ser inferiores al potencial de la célula, limitando la absorción del agua y perdurando por mucho tiempo, en donde la planta puede llegar a morir (Argentel *et al.*, 2006).

*Efecto de salinidad en el desarrollo vegetativo.* Según García y Jáuregui (2008), la salinidad es uno de los principales factores abióticos que limitan la productividad agrícola, debido a que la inmensa mayoría de las plantas

cultivadas son sensibles a esta condición. El efecto más común sobre las plantas es la reducción del desarrollo debido a una disminución del potencial osmótico del medio de crecimiento y, en consecuencia, de su potencial hídrico; la toxicidad iónica normalmente es asociada con la absorción excesiva de Na<sup>+</sup> y de Cl<sup>-</sup> y un desequilibrio nutricional debido a la interferencia de los iones salinos con la absorción de los nutrientes esenciales que requiere la planta.

Leidi y Pardo (2002), mencionan que el efecto evidente ante el estrés salino en la reducción en la capacidad de absorción de agua se puede manifestar en la reducción de expansión foliar y pérdida de turgencia, es decir, una célula vegetal expuesta a un medio salino equilibra su potencial hídrico perdiendo agua, lo que produce la disminución del potencial osmótico y del de turgencia.

Esta situación genera señales químicas (aumento del Ca libre intracelular, síntesis de ABA, entre otros) que desencadenan posteriores respuestas adaptativas (Hasegawa *et al.*, 2000). Aparentemente, los cambios anatómicos son respuestas morfogenéticas de la planta para contrarrestar los efectos negativos de las sales, cambios que pueden ser importantes en la eficiencia del uso del agua y la tolerancia de la planta al estrés salino (Pio *et al.*, 2001).

La toxicidad metabólica del Na está asociada con perturbaciones en la membrana celular y con la competencia por los sitios de enlace del K esencial para el metabolismo. Una alta concentración de Na desplaza los iones de Ca de los sitios de enlace de la membrana celular en la raíz y altera su permeabilidad, lo que causa una salida de K de las células y favorece la entrada de Na (Dood *et al.*, 2010).

Las altas concentraciones de Na deterioran la selectividad de la membrana y favorecen la acumulación pasiva de Na en raíces y tallos, ya que las elevadas concentraciones de sales en el suelo inhiben el crecimiento de las plantas de diferentes formas; causando disminución del



contenido de agua en la planta, acumulación de iones en cantidades tóxicas y reducción de la disponibilidad de nutrimentos (Madueño-Molina *et al.*, 2006).

El Cl por su parte, aún cuando es un elemento esencial para el crecimiento de las plantas, puede causar toxicidad cuando su concentración en el tejido vegetal es excesiva (Zhu, 2001). Las altas concentraciones de Cl producen quemaduras en las hojas, disminuyen la fotosíntesis e inhiben la absorción de nitratos (Villa *et al.*, 2006).

La problemática que genera el estrés salino apunta dificultades impuestas por la mayor osmolaridad del suelo y el daño celular infligido por la excesiva acumulación de iones en los tejidos vegetales (Reyes *et al.*, 2008).

*Efectos por salinidad a nivel vegetal.* Existen diversos daños que provoca el estrés por salinidad en las diferentes especies cultivadas tales como lo son trigo, pimiento, tomate, melón, brócoli, fresa y chile ancho, se destacan como principales efectos los siguientes: según Parés *et al.* (2008), la salinidad origina reducción del crecimiento de los cultivos al afectar negativamente la germinación y/o la capacidad de emerger de las plántulas. Igualmente, retarda el crecimiento de las plantas a través de su influencia sobre varios procesos fisiológicos, tales como: fotosíntesis, conductancia estomática, ajuste osmótico, absorción de iones, síntesis de proteínas, síntesis de ácidos nucleicos, actividad enzimática y balance hormonal; además, puede afectar el proceso de transporte de agua e iones, lo que promueve toxicidad iónica y desbalance nutricional. En consecuencia, las variables de crecimiento vegetativo tales como: masa seca, altura de la planta y área foliar, entre otras, son severamente afectada por la presencia de sales.

Uno de los primeros efectos fisiológicos que provoca el estrés salino en las plantas es la reducción del crecimiento debido a una disminución en la capacidad de absorción de agua de estas; por lo que este se convierte en un buen indicador para evaluar la capacidad de

algunos productos de proteger a las plantas contra este tipo de estrés (Núñez *et al.*, 2007). Este efecto osmótico consiste en que altas concentraciones de sales incrementan las fuerzas potenciales que retienen al agua en la solución del suelo y hace más difícil la extracción del agua por las raíces de la planta, incrementando la energía necesaria para su absorción (Santamaría-César *et al.*, 2004).

Entre los síntomas más comunes en tejido foliar se presenta la necrosis en los bordes de las hojas, la cual comienza en el extremo distal de los folíolos y luego avanza hasta el extremo proximal, muchas veces sin que se presente una franja clorótica intermedia entre el área necrótica y la sana (Casierra-Posada y García, 2005).

Argentel *et al.* (2006) aportan que diversas investigaciones sobre el efecto que provoca la salinidad en la concentración de pigmentos son abundantes y coincidentes, y tienden a revelar que tales afectaciones se deben fundamentalmente a la destrucción de los cloroplastos y a un aumento de la actividad de la enzima clorofilasa, afectando la síntesis de clorofilas. La concentración de pigmentos disminuye significativamente en hojas de las plántulas de trigo cultivadas en condiciones de estrés, destacándose una mayor afectación en el contenido de clorofilas respecto a los carotenoides.

Por otra parte, se observaron efectos adversos en pimiento en estas plantas a los ocho días de salinización, presentando clorosis y abscisión de hojas adultas. También se añade un efecto más respecto a este estrés, en donde la producción de etileno se ve afectada, ya que se han encontrado resultados en los cuales la cantidad de etileno tanto de la parte aérea y de la raíz disminuyó de manera significativa (más de un 25%) como consecuencia de la salinidad en el tomate, melón y brócoli, mientras que aumentó más de cuatro veces en la parte aérea del pimiento, y alrededor de un 20% en la raíz (Zapata *et al.*, 2003).

En el cultivo de fresa, la necrosis en hojas adultas se presenta de forma mayor que en las hojas jóvenes, lo cual indican Casierra-Posada y García (2005); las plantas de fresa acumulan los iones tóxicos en las hojas adultas como respuesta a la toxicidad por NaCl, lo que posteriormente ocasiona que las hojas se necrosen por completo y se caigan, lo que ocurre para la mayoría de las plantas sometidas a estrés por sales.

Ramírez-Serrano *et al.* (2008) reportan en Chile ancho una disminución del contenido de Ca, Mg, K y Mn en presencia de estrés salino, registrándose en los frutos daños por necrosis celular en el fruto.

## Conclusiones

La afectación por concentración de sales presenta efectos adversos, los cuales son irreparables, ya que las respuestas van desde necrosis hasta pérdida de crecimiento, en donde el fruto a su vez es afectado total o parcialmente. La acumulación de sales en las plantas es un problema, ya que de la producción de las mismas depende la alimentación de la humanidad.

## Literatura citada

ARGENTEL, L., González, L. M., Ávila, C y Aguilera, R. 2006. Comportamiento del contenido relativo de agua y la concentración de pigmentos fotosintéticos de variedades de trigo cultivadas en condiciones de salinidad. *Cultivos Tropicales*. 27(3):49-53.

BAYUELO-JIMÉNEZ, J. S., Debouck, D.G., Lynch, J.P. 2002. Salinity tolerance in *Phaseolus* species during early vegetative growth. *Crop Science*. 42:2184-2192.

CARTER, M. R. 2002. Soil quality for sustainable land management: organic matter and aggregation interactions that maintain soil functions. *Agronomy Journal*. 94:38-47.

CASIERRA-POSADA, F. y García, N. 2005. Crecimiento y distribución de materia seca en cultivares de fresa (*Fragaria sp.*) bajo estrés salino. *Agronomía Colombiana*. 23(1):83-89.

DODD, K., Guppy, C., Lockwood, P., Rochester, I. 2010. The effect of sodicity on cotton: plant response to solutions containing high sodium concentrations. *Plant Soil*. 330:239-249.

GARCÍA, M. y Jáuregui, D. 2008. Efecto de la salinización con NaCl o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre la anatomía foliar en dos genotipos de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) con tolerancia salina diferencial. *ERNSTIA* 18(1):89-105.

GONZÁLEZ-EGUIARTE, D. R., Ruiz-Corral, J.A., Castellanos, J. Z. 2004. Delimitación de áreas salinas en el distrito de riego de Caborca, Sonora, México. *Terra Latinoamericana*. 22(1):91-97.

HASEGAWA, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51: 463-499.

LEIDI, E. O., y Pardo, J. M. 2002. Tolerancia de los cultivos al estrés salino. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias*. 2(2):2-10.

MADUEÑO-MOLINA, A., García-Paredes, D., Martínez-Hernández, J., Rubio-Torres, C. 2006. Germinación y desarrollo de plántulas de frijolillo *Rhynchosia minima* (L) DC en condiciones de salinidad. *Ídem*. 24(1):47-54.

MELONI, D.A., Ayrault, G., David, R.N., Abdala, G., 2008. Tolerancia a la salinidad en dos portainjertos de citrus: crecimiento, composición mineral y ajuste osmótico. *Rev. FCA UNCuyo*. 40(2):97-104.

MESA, D. 2003. Obtención de plantas resistentes a la salinidad para los suelos salinos cubanos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 37(3):217-226.

MEZA, N., Arizaleta, M., y Bautista, D. 2007. Efecto de la salinidad en la germinación y emergencia de semillas de parchita (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). *Rev. Fac. Agron (LUZ)*. 24(4):69-80.

NÚÑEZ, M., Mazorra, L.M., Martínez, L., González, M.C., y Robaina, C. 2007. Análogos de brasinoesteroides revierten parcialmente el impacto del estrés salino en el crecimiento inicial de las plántulas de dos genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.). *Cultivos Tropicales*. 28(2):95-99.

OLIVA, M.A., Rincón, R., Zenteno, E., Pinto, A., Dendooven, L., Gutiérrez, F. 2008. Rol del vermicompost frente al estrés por cloruro de sodio en el crecimiento y fotosíntesis en plántulas de tamarindo (*Tamarindus indica* L.). *Gayana Botánica*. 65(1):10-17.

PARTIDA-RUVALCABA, L., Velázquez-Alcaraz, T.J., Acosta-Villegas, B., Angulo-Gaxiola, C.E. 2006. Extractos vegetales y su efecto en la conductividad eléctrica de dos suelos salinos y de soluciones. *Ídem*. 24(1):83-89.

PARÉS, J., Arizaleta, M., Sanabria, M.E., y García, G. 2008. Efecto de los niveles de salinidad sobre la densidad estomática, índice estomático y el grosor foliar en plantas de *Carica papaya* L. *Acta Botánica de Venezuela*. 31(1):27-34.

PIO, A., Horst, C., Martínez, H., Martínez, C., Mosquim, P. 2001. Características fisiológicas de porta-enxertos de videira em solução salina. *Sci. Agric*. 58(1): 139-143.


RAMÍREZ-SERRANO, R., Larrinaga-Mayoral, J.A., Murillo-Amador, B., Hernández-Saavedra, N.Y., Fujiyama, H. 2008. Respuesta antioxidante enzimática en frutos de Chile ancho (*Capsicum annuum* L.) bajo condiciones de estrés salino. *Ídem*. 33(5):377-388.

REYES, Y., Mazorra, L.M. y Núñez, M. 2008. Aspectos fisiológicos y bioquímicos de la tolerancia del arroz al estrés salino y su relación con los brasinoesteroides. *Cultivos Tropicales*. 29(4):67-75.

RIVERA-AGUILAR, V., Manuell Cacheux, I., Godínez Álvarez, H. 2004. Las costras biológicas del suelo y las zonas áridas. *Ciencias*. 75:24-27.

SANTAMARÍA-CÉSAR, J., Figueroa-Viramontes, U., Medina-Morales, M.C. 2004. Productividad de la alfalfa en condiciones de salinidad en el Distrito de Riego 017, Comarca Lagunera. *Ídem*. 22(3):343-349.

VILLA-CASTORENA, M., Catalán Valencia, E.A., Inzunza Ibarra, M.A., Ulery, A.L. 2006. Absorción y traslocación de sodio y cloro en plantas de Chile fertilizadas con nitrógeno y crecidas con estrés salino. *Fitotecnia Mexicana*. 29(1):79-88.

- ZAMUDIO-GONZÁLEZ, B., López-Pérez, L., Alcántar-González, Gabriel., González-Eguiarte, D.R., Ruiz-Corral, J.A., Castellanos, J.Z. 2004. Delimitación de áreas salinas en el distrito de riego de Caborca, Sonora, México. *Ídem*. 22(1):91-97.
- ZAPATA, P.J., Botella, M.A., Pretel, M.T., Amorós, A., Serrano, M. 2003. Implicación del etileno en la respuesta al estrés salino en varias especies vegetales. *Actas de Horticultura N° 39. X Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas*. Pontevedra, España.
- ZEKRI, M., Parsons, L. R. 1992. Salinity tolerance of citrus rootstocks. Effects of salt on root and leaf mineral concentrations. *Plant Soil*.147:171-181.
- ZHU J K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci*. 6:66-71. 

---

Este artículo es citado así:

Martínez-Villavicencio, N., C. V. López-Alonzo, M. Basurto-Sotelo, R. Pérez-Leal. 2011: *Efectos por salinidad en el desarrollo vegetativo*. *TECNOCENCIA Chihuahua* 5(3): 156-161.

## Resúmenes curriculares de autor y coautores

**NALLELY MARTÍNEZ VILLAVICENCIO.** Cursó la carrera de Licenciado en Administración Agrotecnológica en la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, obteniendo el primer lugar académico de su generación, así como mención honorífica en la sustentación de su tesis. Egresó de la Maestría en Ciencias de la Productividad Frutícola de la misma facultad. Ha colaborado en las investigaciones de *Análisis de crecimiento en rosa cv. Freedom sometida a privación de calcio y boro*; y *desarrollo trabajos de investigación en fisiología de semillas de la familia Passiflorácea para la caracterización física y bioquímica de semillas a través del proyecto de recursos genéticos de esta especie*, durante su estancia en Bogotá en la Universidad Nacional de Colombia; allí mismo participó como coautora del libro *Avances sobre fisiología de la producción de flores de corte en Colombia*. Entre sus artículos de divulgación se encuentran: «Estrés salino en el cultivo de rosas» y «Los compuestos esteroidales o saponinas en la palma del desierto (*Yucca schidigera*) y sus aplicaciones». También ha desarrollado investigación en «Factores nutrimentales, químicos y de hormonas en producción y poscosecha del cultivo de rosas».

**CARLOS VENTURA LÓPEZ ALONZO.** Desarrolló investigación en técnicas de propagación *in vitro* como alternativa para producción intensiva del recurso *Yucca schidigera* L. con la cual sustentó examen de grado y publicó el artículo: «Los compuestos esteroidales o saponinas en la palma del desierto (*Yucca schidigera*) y sus aplicaciones». Durante su estancia de investigación en la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, participó en el proyecto «Caracterización de fruto y semilla de diferentes ecotipos de chulupa (*Passifloras maliformes*)». Es egresado de la Maestría en Ciencias de la Productividad Frutícola de la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Cursó la carrera de Ingeniero Agrónomo en el Instituto Tecnológico de Conkal, en Mérida Yucatán. Así mismo es coautor de la publicación «Estrés salino en el cultivo de rosas».

**MOISÉS BASURTO SOTELO.** El doctor Basurto cursó la licenciatura en la Facultad de Fruticultura hoy Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, obteniendo el título de Ingeniero Fruticultor en Diciembre de 1984. La Facultad de Ciencias Agrotecnológicas le otorga el grado de Maestro en Ciencias de la Productividad Frutícola en 1995. En diciembre del 2005 obtuvo el grado de Doctor en Philosophy, en la especialidad de Recursos Naturales, por la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Labora en la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas como catedrático de tiempo completo desde 1984 desarrollando experiencia laboral en actividades de docencia, investigación, administrativa y de divulgación entre otras, pertenece al cuerpo académico CA-11 Frutales de Zona Templada con área de especialización en cultivo de Nogal, Hortalizas y productos naturales.

**RAMONA PÉREZ LEAL.** La Doctora Ramona cursó la licenciatura en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, obteniendo el título de Licenciado Químico Farmacéutico Biólogo en Junio de 1995. Obtuvo la Maestría y el Doctorado en el Instituto de Horticultura del departamento de Fitotecnia en la Universidad Autónoma Chapingo con orientación en Fitoquímica en Junio del 2004. Labora en la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas como catedrático de tiempo completo desde 2008 desarrollando experiencia laboral en actividades de docencia e investigación. Pertenece al cuerpo académico CA-11 Frutales de Zona Templada con área de especialización en fitoquímica de frutales de zona templada y recursos genéticos propios del estado de Chihuahua.

# Guía para autores de escritos científicos

## Política editorial

Son bienvenidos manuscritos originales e inéditos de tipo científico, tecnológico o humanístico, los cuales deberán estar escritos en un lenguaje accesible a lectores con formación profesional, atendiendo a los principios de: precisión, lógica y claridad. Todo manuscrito recibido es revisado en primera instancia por el Comité de Editores Asociados, para asegurar que cumple con el formato y contenido establecido por las normas editoriales de *TECNOCIENCIA Chihuahua*. Una vez revisado el escrito, los editores asociados determinarán si vale la pena publicarlo; enseguida se le regresa al autor responsable para que incorpore las observaciones y sea editado. Posteriormente, es sometido a un estricto arbitraje bajo el sistema de doble ciego, realizado por dos especialistas en el área del conocimiento. Para su evaluación se aplican los criterios de: rigor científico, calidad y precisión de la información, relevancia del tema y la claridad del lenguaje.

Los árbitros prestarán especial atención a la originalidad de los escritos, es decir, revisarán que dicho manuscrito sea producto del trabajo directo del autor o autores y que no haya sido publicado o enviado algo similar a otras revistas. Los artículos deben presentar: un análisis detallado de los resultados así como un desarrollo metodológico original, una manipulación nueva del tema investigado o ser de gran impacto social. Solo serán aceptados trabajos basados en encuestas donde se incluyan mediciones, organización, análisis estadístico, prueba de hipótesis e inferencia sobre los datos obtenidos del estudio.

## Lineamientos generales

Se aceptan manuscritos originales e inéditos, producto de la creatividad del o los autores, cuyos resultados de investigación no hayan sido publicados parcial o totalmente (excepto como resumen de algún congreso científico), ni estén en vías de publicarse en otra revista (nacional o internacional) o libro.

Para tal fin, el autor y coautores deberán firmar la carta de autoría, donde declaran que su trabajo no ha sido publicado o enviado para su publicación simultáneamente en otra revista; además, en dicho documento señalarán estar de acuerdo en aceptar las normas y procedimientos establecidos por el Consejo Editorial Internacional de la Revista *TECNOCIENCIA Chihuahua*, especificando el nombre del investigador a quien se dirigirá

toda correspondencia oficial (autor de correspondencia).

Se aceptan artículos en español o inglés, sin embargo, tanto el título como el resumen deberán escribirse en ambos idiomas. El contenido puede ser cualquier tema relacionado con algunas de las áreas del conocimiento definidas previamente o que a juicio del Consejo Editorial Internacional pueda ser de interés para la comunidad científica.

El Comité Editorial del área a la que se envíe el manuscrito, revisará que los resultados obtenidos sean de impacto regional, nacional o internacional. Además, prestará atención a la metodología en la que se sustenta la información y que esta sea adecuada y verificable por otros investigadores. No se aceptarán artículos basados en pruebas de rutina, o cuyos resultados experimentales se obtuvieron sin un método estadístico apropiado.

Cuando un artículo presente resultados experimentales con un alcance limitado puede recomendarse su publicación como una Nota Científica. Reconocemos que una mejora de la calidad de la revista es responsabilidad tanto del Consejo Editorial Internacional como de los autores.

## Manuscritos

Se entregarán cuatro copias impresas y una versión electrónica del manuscrito. También podrán remitirse los manuscritos a las direcciones electrónicas de la revista que fueron mencionadas anteriormente pero la carta de pre-

sentación, firmada debidamente por los autores, deberá entregarse personalmente en las oficinas de la Dirección de Investigación y Posgrado; también puede escanearse para su envío por correo electrónico o remitirse por fax [(614) 439-1823]. Todo manuscrito deberá acompañarse con la carta de autoría firmada por todos los autores, cuyo formato es proporcionado por la revista. En la carta deberá indicarse el orden de coautoría y el nombre del autor de correspondencia con la revista, para facilitar la comunicación con el Editor en Jefe. Esta carta debe incluir datos completos de su domicilio, número de fax y dirección electrónica.

### Formato

El manuscrito científico tendrá una extensión máxima de 25 cuartillas, incluyendo figuras y cuadros, sin considerar la página de presentación. Para su escritura se utilizará procesador Word 6.0 o posterior, para Windows 98 o versión más reciente; todo texto se preparará utilizando letra Arial 12 puntos, escrito a doble espacio y numerando páginas, renglones, cuadros y figuras del documento para facilitar su evaluación. Utilizar un margen izquierdo de 3.0 cm. y 2.0 para el resto. Se recomienda no utilizar sangría al empezar cada párrafo del manuscrito. Los manuscritos de las diferentes categorías de trabajos que se publican en la revista deberán contener los componentes que a continuación se indican, empezando cada uno de ellos en página aparte.

- Página de presentación.
- Resumen en español (con palabras clave en español).
- Resumen en inglés, *abstract* (con palabras en inglés, *keywords*).

- Texto (capítulos y su orden).
- Agradecimientos.
- Literatura citada.
- Cuadros y gráficas.

**Página de presentación.** Esta página no se numera y debe contener: a) Títulos en español e inglés, escritos en mayúsculas y minúsculas, letras negritas y centradas; b) Nombres de los autores en el orden siguiente: Nombres y apellidos de autor y coautores, uniendo con un guión el apellido paterno y materno de cada uno; además, incluir su afiliación institucional; c) Información completa (incluyendo teléfono, domicilio con el código postal y dirección electrónica) anotando departamento e institución a la que pertenece el autor y coautores; si el autor y coautores pertenecen a la misma institución, no es necesario numerarlos (ver ejemplo mostrado en el cuadro de texto). Como una norma general, el Editor en Jefe se dirigirá solamente al autor de correspondencia mencionado en la carta de autoría y no se proporcionará información alguna a otra persona que lo solicite.

**Título.** Es indicador del contenido del artículo, y si está escrito apropiadamente, facilitará indexarlo. Un buen título es breve (no más de 15 palabras), descriptivo e identifica el tema y propósito del estudio; al escribir el título debe elegirse palabras de gran impacto que revele la importancia del trabajo. Es recomendable evitar el uso de palabras o frases que tienen poco impacto y que no proporcionan información relevante sobre el contenido del estudio; como ejemplos pueden citarse: “Estudio de...”, “Influencia de la...”, “Efecto del...”, etc.

**Resumen en español.** Al leer un resumen, el investigador puede reconocer el valor del contenido del escrito científico y decidir si lo revisa todo; por lo tanto, el resu-

**Cuadro 1.** Ejemplo de una página de presentación de un manuscrito científico que incluye títulos, autores y coautores, así como nombre de institución de adscripción y datos generales para propósitos de comunicación.

## Análisis de áreas deforestadas en la región centro-norte de la Sierra Madre Occidental de Chihuahua, México

### Deforest analysis areas in the north central region of the Sierra Madre Occidental of Chihuahua, Mexico

CARMELO PINEDO ÁLVAREZ,<sup>1</sup> ALFREDO PINEDO ÁLVAREZ,<sup>2</sup>  
REY MANUEL QUINTANA MARTÍNEZ,<sup>1</sup> Y MARTÍN MARTÍNEZ SALVADOR<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Profesor de la Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua. Periférico Francisco R. Almada, Km 1 de la Carretera Chihuahua-Cauhtémoc. Chihuahua, Chih., México, 31031. Tel. (614) 434-0303. cpinedo@uach.mx.

<sup>2</sup> Estudiante de posgrado de la Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua.

<sup>3</sup> Investigador del Campo Experimental La Campana-Madera, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Av. Homero 3744, Fracc. El Vergel. Chihuahua, Chih., México, 31100.

men proporciona valiosa información del estudio y también le facilita al lector decidir si lee todo el escrito. En la segunda página se debe incluir un resumen que no exceda las 250 palabras. En él se indicarán la justificación y objetivos del estudio; dar una breve descripción de la metodología empleada; describir los resultados más relevantes y presentar datos numéricos importantes (ejemplo: *se observó un incremento de 15% en el rendimiento con la densidad de 60,000 plantas por hectárea*), y de ser posible, enfatizar el significado estadístico y escribir la conclusión general del trabajo.

**Palabras clave.** Después del resumen, en punto y aparte, escribir alfabéticamente de 4 a 6 palabras o frases cortas clave diferentes a las del título, que ayuden a indexar y clasificar el trabajo de acuerdo a su contenido. Las palabras se publicarán junto con el resumen. Los nombres de especies biológicas se escriben al principio de esta sección.

**Resumen en inglés (abstract).** Debe ser una traducción exacta del resumen en español, para ello es conveniente que los autores busquen la asesoría de profesionales de las ciencias que dominen el idioma inglés.

**Palabras clave en inglés (keywords).** Son las mismas palabras indicadas para el resumen en español que deberán ser traducidas al idioma inglés con la asesoría de un científico o técnico experto en la lengua.

**Texto (capítulos y su orden).** Existen diferencias en cuanto al contenido y estructura de cada una de las categorías de escritos científicos, que son publicados en la revista. Las normas específicas para cada categoría son descritas enseguida, y para aquellos escritos recibidos que no se ajusten a estos formatos, el Consejo Editorial decidirá si pueden enviarse para su revisión al Comité Editorial del área correspondiente.

## 1. Artículo científico

Trabajo completo y original, de carácter científico o tecnológico, cuyos resultados se obtuvieron de investigaciones conducidas por los autores en alguna de las seis áreas del conocimiento citadas inicialmente. El manuscrito científico se divide en los capítulos siguientes:

- Resumen y *abstract*.
- Introducción.
- Materiales y métodos.
- Resultados y discusión.
- Conclusiones.
- Agradecimientos.
- Literatura citada.

### Resumen y *abstract*

En una sección previa fueron descritas las normas editoriales para elaborar esta sección del escrito científico.

### Introducción

- a) Es importante resaltar el *tema* del que trata la investigación. Se recomienda iniciar esta sección redactando una o dos oraciones de carácter universal, que sirva al investigador como argumento científico al describir su trabajo. A continuación se cita un artículo, cuyo título es: “Olor penetrante y azúcares de cultivares de cebolla de días cortos afectados por nutrición azufrada”. Los autores empiezan con las oraciones siguientes:

“El sabor en la cebolla (*Allium cepa*) depende de hasta 80 compuestos azufrados, característicos del género *Allium*, además de varios carbohidratos solubles en agua. La intensidad del sabor es determinada por el genotipo de la variedad de cebolla y el ambiente en que se cultiva”.

- b) También debe incluirse la *información previa* y *publicada* sobre el tema del estudio (*antecedentes*). Para orientar al lector es suficiente incluir referencias bibliográficas relevantes y recientes, en lugar de una revisión extensa de citas a trabajos viejos y de poca importancia sobre el tópico investigado. A continuación se presenta un ejemplo de cómo presentar cronológicamente las citas bibliográficas:

“La existencia de variación genética dentro de los cultivares de cebolla ha sido demostrada para intensidad de sabor y contenido total de azúcares” (Darbyshire y Henry, 1979; Bajaj *et al.*, 1980; Randle, 1992b).

- c) *Problema a resolver*. Con una o dos oraciones especificar el problema abordado, justificar la realización del estudio, o bien, enunciar la hipótesis planteada por el investigador y cuya validez será probada por el experimento. Siguiendo con el ejemplo anterior, se presenta una breve descripción del problema estudiado:

“Se requiere un mayor conocimiento sobre características deseables, como el sabor intenso y contenido de carbohidratos solubles de la cebolla, que son afectadas por la interacción cultivar x niveles de fertilización azufrada”.

- d) *Definición de los objetivos del estudio*. Aquí se enuncia brevemente hacia donde se dirige la in-

vestigación, es decir, se describe la manera o el medio a través del cual se pretende examinar el problema definido o la pregunta planteada por el investigador. Esta parte de la introducción permitirá al lector ver si las conclusiones presentadas por el investigador son congruentes con los objetivos planteados al inicio del trabajo. Ejemplo:

*“Los objetivos de esta investigación fueron: Evaluar cultivares de cebolla de fotoperiodo corto, caracterizadas por su poco sabor y bajo contenido de carbohidratos solubles en agua, con niveles bajos y altos de azufre y determinar la asociación de dichas características con la fertilización”.*

### **Materiales y métodos**

Esta sección debe responder a las preguntas: ¿Dónde? ¿Cuándo? ¿Cómo se hizo el trabajo? Puede incluir cuadros y figuras. El autor debe proporcionar información concisa, clara y completa, para que las técnicas y/o los procedimientos descritos así como las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo el estudio, puedan ser repetibles por otros investigadores competentes en el área (lugar, ciclo o etapa biológica, manejo del material biológico, condiciones ambientales, etc.).

Si un procedimiento es ampliamente conocido basta con citar a su(s) autor(es); sin embargo, cuando el método seguido ha sido modificado, debe proporcionarse detalles suficientes del mismo así como de un diseño experimental inusual o de los métodos estadísticos aplicados para el análisis de los resultados (arreglo de tratamientos, diseño experimental, tamaño de la unidad experimental, variables de respuesta, proceso de muestreo para obtener los datos, análisis estadístico de los datos, técnica de comparación de medias, etc.). Es recomendable dar una descripción cronológica del experimento y de los pasos de la metodología aplicada.

Al describir los materiales, deben señalarse especificaciones técnicas, cantidades, fuentes y propiedades de los materiales indicando nombre y dirección del fabricante. Para el caso de material biológico, dar información suficiente de las características particulares de los organismos (edad, peso, sexo, etapa fenológica, etc.); es importante también identificar con precisión el género, especie y nombre del cultivar o raza utilizado en el estudio. Si se trata de material no vivo, por ejemplo suelo cultivado, proporcionar los datos taxonómicos para facilitar su identificación.

### **Resultados y discusión**

En esta parte importantísima del manuscrito los resultados derivados del estudio se distinguen porque: son presentados en forma de cuadros y figuras, analizados estadísticamente e interpretados, bajo la luz de la hipótesis planteada antes de iniciar la investigación. Es recomendable que el autor incluya un número óptimo de cuadros y figuras de buena calidad, que sean absolutamente necesarios y que sirvan como fundamento para mejorar la comprensión de los resultados y darle soporte a la hipótesis sometida a prueba.

Cada cuadro y figura debe numerarse; su título debe ser claro y descriptivo; los símbolos y abreviaturas incluidos deben ser explicados apropiadamente. Los cuadros y figuras elaborados a partir de los *resultados* deben ser explicativos por sí mismos; los comentarios que se hagan deben resaltar características especiales tales como: Relaciones lineales o no lineales entre variables, una cantidad estadísticamente superior a otra, tendencias, valores óptimos, etc. En síntesis responde a la pregunta “¿qué ocurrió?”.

En la sección de *discusión* los datos presentados en forma de cuadros y figuras son interpretados enfocando la atención hacia el problema (o pregunta planteada) definido en la introducción, buscando demostrar la validez de la hipótesis elaborada por el investigador. Una buena discusión puede contener:

- a) Principios, asociaciones y generalizaciones basadas en los resultados;
- b) excepciones, variables correlacionadas o no y definición de aspectos del problema no citados previamente pero que requieren ser investigados;
- c) énfasis sobre resultados que están de acuerdo con otro trabajo (o lo contradicen), y
- d) implicaciones teóricas o prácticas.

Cuando la discusión se presenta en una sección separada no debe escribirse como una recapitulación de los resultados, pero debe centrarse en explicar el significado de ellos y explicar cómo proporcionan una solución al problema abordado durante el estudio. Cuando se comparan los resultados del presente estudio con otros trabajos, ya sea que coincidan o estén en desacuerdo con ellos, deben citarse las referencias más pertinentes y recientes.

### **Conclusiones**

Es aceptable escribir en una sección separada una o varias conclusiones breves, claras y concisas, que se desprenden de los resultados de la investigación y que sean

una aportación muy concreta al campo del conocimiento donde se ubica el estudio. No se numeran las conclusiones y al redactarlas debe mantenerse la congruencia con los objetivos del trabajo y el contenido del resumen.

### Agradecimientos

En esta sección se da el crédito a personas o instituciones que apoyaron, financiaron o contribuyeron de alguna manera a la realización del trabajo. No se debe mencionar el papel de los coautores en este apartado.

### Literatura citada

Incluye la lista de referencias bibliográficas citadas en el manuscrito científico, ordenadas alfabéticamente y elaborada conforme a las reglas siguientes:

1. Es recomendable que las referencias bibliográficas obtenidas sean preferentemente de: *Artículos científicos* de revistas periódicas indexadas, *capítulos o libros y manuscritos en extenso* (4 o más cuartillas) publicados en memorias de congresos científicos.
2. Al escribir una referencia empezar con el apellido paterno (donde sea costumbre agregar enseguida el apellido materno separado por un guión) del autor principal y luego las iniciales de su(s) nombre(s). Enseguida escriba la inicial del nombre del segundo autor y su primer apellido. Continuar así con el tercero y siguientes autores separando sus nombres con una coma y una y entre el penúltimo y último autor.
3. Colocar primero las referencias donde un autor es único y enseguida donde aparece como autor principal. En estos casos el orden de las citas se establece tomando como base el apellido del primer coautor que sea diferente.
4. En las citas donde el(los) autor(es) sea(n) los mismos, se ordenarán cronológicamente; se utilizarán letras en referencias de los mismos autores y que fueron publicadas en el mismo año (2004a, 2004b, 2004c, etc.).
5. Títulos de artículos y de capítulos de libros se escribirán con minúsculas (excepto la primera letra del título y nombres propios). Los títulos de libros llevan mayúsculas en todas las palabras excepto en las preposiciones y artículos gramaticales.

Cada uno de los tipos de referencias bibliográficas y las reglas para citarlas se ilustran con ejemplos enseguida:

#### *Artículos científicos de revistas periódicas*

- GAMIELY, S., W. M. Randle, H. A. Mills, and D. A. 1991. Onion plant growth, bulb quality, and water uptake following ammonium and nitrate nutrition. *HortScience* 26(9):1061-1063.
- RANDLE, W. M. 1992a. Sulfur nutrition affects nonstructural water-soluble carbohydrates in onion germplasm. *HortScience* 27(1):52-55.
- RANDLE, W. M. 1992b. Onion germplasm interacts with sulfur fertility for plant sulfur utilization and bulb pungency. *Euphytica* 59(2):151-156.

#### *Capítulos de libros*

- DARBYSHIRE, B. and B. T. Steer. 1990. Carbohydrate biochemistry. In: H.D. Rabinowitch and J.L. Brewster (eds.). *Onions and allied crops. Vol. 3. CRC Press, Boca Raton, Fla. p. 1-6.*

#### *Libros*

- STEELE, R. G. D. and J. H. Torrie. 1960. Principles and Procedure of Statistics: A Biometrical Approach. McGraw-Hill Book Company Inc. New York. 481 p.

#### *Memorias de Congresos científicos*

- MATA, R. J., F. Rodríguez y J. L. Pérez. 2005. Evaluación de aditivos fertilizantes: raíz-set LSS (producto comercial) y root N-Hancer (producto experimental) en la producción de ajo (*Allium sativum* L.) y cebolla (*Allium cepa* L.) en Chapingo, México. In: Memoria de artículos en resumen y en extenso, XI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas (SOMECH). 27-29 de septiembre de 2005. Chihuahua, Chih., México. p. 134.

#### *Boletín, informe, publicación especial*

- HOAGLAND, D. R. and D. I. Arnon. 1980. The water culture method for growing plants without soil. Calif. Agr. Exp. Sta. Circ. 347. 50 p.
- ALVARADO, J. 1995. Redacción y preparación del artículo científico. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Publicación Especial 2. 150 p.
- US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY(USEPA). 1981. Process design manual for land treatment of municipal wastewater. USEPA Rep. 625/1-77-008 (COEEM1110-1-501). U.S. Gov. Print. Office, Washington, D.C. 60 p.

## 2. Nota científica

Son de menor extensión que un artículo (máximo 10 cuartillas a doble espacio, incluyendo cuadros y figuras).

Pueden incluirse:

- a) Descubrimientos o aportaciones breves, obtenidas de un estudio reciente de carácter local o limitado;
- b) el producto de modificaciones o mejoramiento de técnicas, procedimientos experimentales, análisis estadísticos, aparato o instrumental (de laboratorio, invernadero o campo);
- c) informes de casos clínicos de interés especial;
- d) resultados preliminares, pero importantes y novedosos, de investigaciones en desarrollo, o bien,
- e) desarrollo y aplicación de modelos originales (matemáticos o de cómputo) y todos aquellos resultados de investigación que a juicio de los editores merezcan ser publicados.

Como en el caso de un artículo extenso, la nota científica debe contener: a) *título* (español e inglés), b)



autor(es), c) institución de adscripción del autor(es), d) resumen (en español e inglés), e) palabras clave (español e inglés). El texto de una nota científica contendrá también la misma información señalada para un artículo extenso: f) introducción, g) materiales y métodos, h) resultados y discusión, e i) conclusiones, sin embargo, su redacción será corrida de principio a final del trabajo; esto no quiere decir que sólo se supriman los subtítulos, sino que se redacte en forma continua y coherente. La nota científica también incluye el inciso k) bibliografía.

### 3. Ensayo científico

Manuscrito de carácter científico, filosófico o literario, que contiene una contribución crítica, analítica y sólidamente documentada sobre un tema específico y de actualidad. Se caracteriza por ser una aportación novedosa, inédita y expresa la opinión del(os) autor(es) así como conclusiones bien sustentadas. Su extensión máxima es de 20 cuartillas a doble espacio (incluyendo cuadros y figuras).

La estructura del ensayo contiene los incisos siguientes: a) Títulos (español e inglés), b) autor(es), c) Institución de adscripción, d) resumen (español e inglés), e) palabras clave (español e inglés), f) introducción, g) desarrollo del tema, g) conclusiones y h) bibliografía. El tópico es analizado y discutido bajo el apartado *Desarrollo del tema*.

### 4. Revisión bibliográfica

Consiste en el tratamiento y exposición de un tema o tópico relevante y de actualidad. Su finalidad es la de resumir, analizar y discutir, así como poner a disposición del lector información ya publicada sobre un tema específico. Ya sea que la revisión temática sea solicitada por el Consejo Editorial a personas expertas o bien que el manuscrito sea presentado por un profesional experimentado, debe resaltarse la importancia y significado de hallazgos recientes del tema. El texto contiene los mismos capítulos de un ensayo, aunque en el capítulo *desarrollo del tema* es recomendable el uso de encabezados para separar las diferentes secciones o temas afines en que se divide la revisión bibliográfica; además, se sugiere el uso de cuadros y figuras para una mayor comprensión del contenido.

*Desarrollo del tema* es recomendable el uso de encabezados para separar las diferentes secciones o temas afines en que se divide la revisión bibliográfica; además, se sugiere el uso de cuadros y figuras para una mayor comprensión del contenido.

### Preparación de cuadros y figuras

Se recomienda insertar los cuadros y figuras, numerados progresivamente, en el lugar correspondiente del texto. Deberá incluirse por separado un archivo para los cuadros y otro para las figuras en formato Excel, con el propósito de editarlos en caso de ser requerido. Los títulos de los cuadros y/o figuras se escriben en letra Arial, negritas y 12 puntos. En los títulos, el uso de las letras mayúsculas se limita a la primera letra y nombres propios.

### Cuadros

Los cuadros con los resultados se presentan en tablas construidas preferentemente con tres o cuatro líneas horizontales; las dos primeras sirven para separar los encabezados, mientras que la(s) última(s), para cerrar la tabla. Las líneas verticales se usan también para distinguir columnas de datos. El cuadro 1 presenta un ejemplo de cuadro con información estadística.

### Figuras

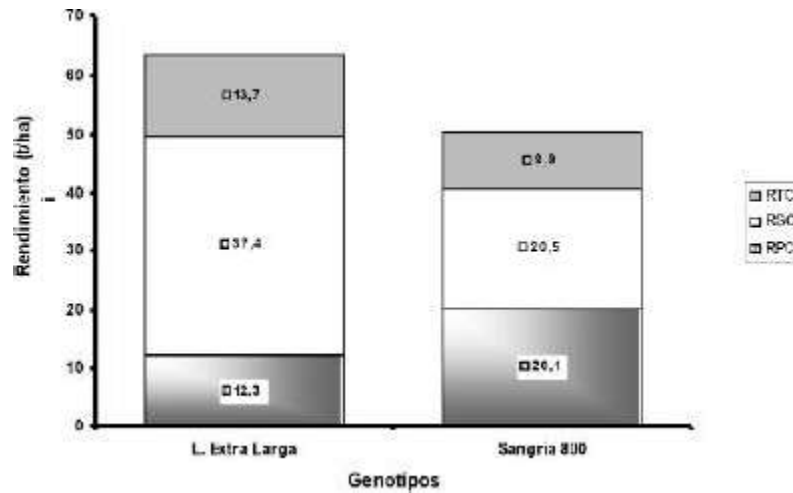
En las figuras no se debe duplicar la información presentada en los cuadros o viceversa. Se recomienda el uso de medidas de acuerdo al Sistema Métrico Decimal y las abreviaturas utilizadas deberán apearse a las recomendaciones que aparecen en la tabla que se anexa al presente documento.

Siempre que se incluyan figuras de línea o de otro tipo deben utilizarse símbolos bien definidos para evitar confusiones. Si se usan gráficas del tipo de barras o pastel, los rellenos deben ser contrastantes. En lo posible, las fotografías incluidas en el manuscrito deben ser en blanco y negro, en formato *tif* con 300 puntos de resolución y enviadas en un archivo electrónico separado.

Cuadro 1. Análisis de varianza de la variable *Peso de flor fresca en Golden Delicious*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumas de cuadrados	Cuadrado medio	F <sub>c</sub> calculada	Significancia P <sub>r</sub> > F <sub>t</sub>
Colector	3	4306,25	1435,42	2,68	0,1099
Día	3	214118,75	71372,92	133,30	0,0001
Error	9	4818,75	535,42	-	-
Total	15	223243,75	Desv. Estándar =	23,14	
Estimadores	CV <sub>(%)</sub> =	10,9	Media =	211,9	

Figura 1. Rendimiento de tres cortes en dos genotipos de sandía (Janos, Chih., UACH-2005).



Cuadro 2. Unidades de medición y abreviaturas de uso frecuente.

Unidades	Abreviatura	Unidades	Abreviatura
cal	Caloría(s)	ml	Mililitro (s)
cm	Centímetro(s)	mm	Milímetro (s)
°C	Grado centígrado(s)	min	Minuto (s)
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50%	ng	Nanogramo (s)
g	Gramo(s)	P	Probabilidad (estadística)
ha	Hectárea(s)	p	Página
h	Hora (s)	PC	Proteína cruda
i. m.	Intramuscular (mente)	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
i. v.	Intravenosa (mente)	pp	Páginas
J	Joule(s)	ppm	Partes por millón
kg	Kilogramo(s)	%	Por ciento (con número)
km	Kilómetro(s)	rpm	Revoluciones por minuto
l	Litro(s)	seg	Segundo (s)
log	Logaritmo decimal	t	Tonelada (s)
Mcal	Megacaloría(s)	TND	Total de nutrientes digestibles
MJ	Megajoule(s)	UA	Unidad animal
M	Metro(s)	UI	Unidades internacionales
msnm	Metros sobre el nivel del mar	vs	Versus
µg	Microgramo(s)	xg	Gravedades
µl	Microlitro(s)	km.h <sup>-1</sup>	Kilómetro por hora
µm	Micrómetro(s) ó micra(s)	t.ha <sup>-1</sup>	Tonelada por hectárea
mg	Miligramo(s)	µg. ml	Microgramos por mililitro

Cualquier otra abreviatura se pondrá entre paréntesis inmediatamente después de la(s) palabra(s) completa(s).

Los nombres científicos y otras locuciones latinas se deben escribir en cursivas, como se indica en los ejem-

plos siguientes: Durazno (*Prunus persica* L. Batsch), Tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.), Hongo fitopatógeno (*Pythium aphanidermatum* Edson), Palomilla de la manzana (*Cydia pomonella* L.), en laboratorio: *in vitro*, sin restricción: *ad libitum*.

# Compost: suelos fértiles

## Compost: suelos fértiles

Alternativa para una empresa  
socialmente responsable

Ofelia Adriana Hernández Rodríguez  
Ana María de Guadalupe Arras Vota  
Luc Erasmata Fierro Murga

ALWAYS LEARNING

PEARSON



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA  
FACULTAD DE INGENIERÍA



PARQUE TECNOLÓGICO DE SOFTWARE



Diseño por M.S.I. Perla I. Cordero De los Ríos  
y M.S.I. Raúl Arturo Acosta Chávez