

43



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**REVISION BIBLIOGRAFICA EXHAUSTIVA
ACERCA DE LOS INHIBIDORES
GLICOPROTEINICOS DE
POLIGALACTURONASAS**

202441

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MARIA DE LA PAZ CELORIO MANCERA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOHN MARCUS LABAVITCH



2001

**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Revisión bibliográfica exhaustiva acerca de los inhibidores glicoproteínicos de poligalacturonasas"

realizado por María de la Paz Celorio Mancera

con número de cuenta 9653287-2, pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

- Propietario Dr. John Marcus Labavitch *John M. Labavitch*
- Propietario M. en C. Aurora Zlotnik Espinosa *Aurora Zlotnik*
- Propietario M. en C. Aida Marisa Osuna Fernández *Aida Marisa Osuna Fernández*
- Suplente M. en C. Rosenda Margarita Ponce Salazar *Rosenda Margarita Ponce Salazar*
- Suplente Dr. Eleazar Martínez Barajas *Eleazar Martínez Barajas*

FACULTAD DE CIENCIAS
 U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología



Edna María Suárez Díaz

Dra. Edna María Suárez Díaz DEPARTAMENTO
 DE BIOLOGÍA

Agradezco a la Dra. Clara Pelayo, el Quím. Dagoberto Castillo, la Enóloga Leticia Chacón y el Ing. Alberto Flores la ayuda y el respaldo que me brindaron durante mi estancia en los EUA y por realizar el contacto con el Dr. John M. Labavitch de la Universidad de California, Davis (UCD), para que yo ingresara en su laboratorio.

Estoy enormemente agradecida con el Dr. John M. Labavitch quien me dio la oportunidad de obtener experiencia de laboratorio durante casi un año interviniendo directamente con distintos proyectos relacionados con los inhibidores glicoproteínicos de poligalacturonasas realizados en la UCD, laboratorio de Fisiología Vegetal y Tecnología de Poscosecha, Pomología. Aunado a lo anterior, el Dr. Labavitch sacrificó su tiempo para guiarme en la realización de mi tesis, me otorgó su amistad y su confianza.

Mi más profunda gratitud al Dr. Carl Greve, quien me transmitió invaluable conocimientos tanto prácticos como teóricos de Bioquímica y Fisiología Vegetal.

De la misma manera quiero agradecer la confianza y apoyo que recibí del Dr. Larry Teuber y de Ken Taggard quienes forman parte del equipo interdisciplinario que desarrolla el proyecto de la PGI de *Medicago sativa* vs la PG de *Lygus hesperus*. Estos dos profesores me involucraron aún más en el proyecto y compartieron conmigo invaluable conocimientos de Agronomía.

Tuve la oportunidad de realizar este estudio en la Universidad de California, Davis, debido a que se me fue otorgada una beca de intercambio académico de la Fundación UNAM para cursar las últimas materias de mi carrera. Al terminar mis estudios, la UCD me dio la oportunidad de continuar un año más en esta institución para obtener experiencia práctica en el laboratorio dirigido por el Dr. Labavitch. Quiero por lo tanto, dar mi más grande agradecimiento a la UNAM, a Fundación UNAM y a la UCD por crear un vínculo por medio del cual se exhorta a los universitarios a ser mejor y ampliar su panorama profesional, además de hacer realidad lo que aprendí en las aulas de la Fac. de Ciencias: la ciencia es un lenguaje universal.

La deuda de gratitud para con la UNAM es impagable, nunca los universitarios que egresamos de sus aulas podremos corresponder a tantos beneficios. A la UNAM debo una formación excelente como profesional y como individuo, sólo puedo corresponder a mi universidad dejando que, en donde quiera que esté, en cualquier situación y momento de mi vida personal y profesional, sea mi espíritu forjado en la Magna Casa de Estudios quien hable por mi raza.

Mil gracias al M. en C. Javier Martínez Ramón que tan amablemente aportó sus comentarios y críticas de vital importancia en la realización del estudio presentado.

Al Quijote encarnado: Lic. Felipe Celorio Celorio por otorgarme los sueños y la libertad.

A mi madre, Sara Mancera con todo mi agradecimiento y admiración por su entrega y cariño ilimitados.

A mi hermana, Marcela Celorio Mancera, esperando que nuestro coeficiente de parentesco=0.5 nos mantenga unidas siempre.

A mis queridos amigos de siempre, los cuales son una prueba más del altruismo biológico.

A esos extraordinarios profesores, quienes inspiran y contagian con su profesionalismo, de los cuales he tenido el honor de ser alumna.

A todos los maravillosos seres humanos que me han tocado mi corazón con su bondad, alegría y amor.

El Salvaje le interrumpió:

-¿Pero no es natural sentir que hay Dios?-

"Un mundo feliz"-Aldous Huxley

Ver sin ojos, sentir sin piel, vivir sin corazón, sometiendo al Sol e invadiéndolo todo; ¡que mundo tan fascinante! ... ¡quien pudiera fotosintetizar!

MPCM

ÍNDICE

PÁG.

INTRODUCCIÓN	VIII
--------------	------

CAPÍTULO I ENZIMAS POLIGALACTURONASAS (PGS-POLYGALACTURONASES)

I.1 DESCUBRIMIENTO	11
I.2 SUSTRATO, CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS	12
I.3 FUNCIONES	
I.3.1 ABCISIÓN	22
I.3.2 DEHISCENCIA	23
I.3.3 MADURACIÓN DE CIERTOS FRUTOS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA	23
I.3.4 ORGANOGÉNESIS	27
I.3.5 POLINIZACIÓN	28
I.3.6 TOXICIDAD	29

CAPÍTULO II POLIGALACTURONASAS PRODUCIDAS POR PATÓGENOS E INSECTOS

I.1 FUNCIÓN EN PATOGÉNESIS	30
I.2 PRUEBAS PRELIMINARES DE LABORATORIO. POLIGALACTURONASA DE <i>Lygus hesperus</i>	34
I.3 APARICIÓN DE MECANISMOS DE DEFENSA VEGETAL	
II.3.1 FITOALEXINAS	38
II.3.2 CASBENO Y ETILENO	41

II.3.3 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	43
II.3.4 LIGNINA	44
II.3.5 MECANISMO DE TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL EMITIDA POR LOS EVOCADORES	45

CAPÍTULO III PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE POLIGALACTURONASA (PGIPS-POLYGALACTURONASE INHIBITOR PROTEINS)

II.1 DESCUBRIMIENTO	52
II.2 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y CLASIFICACION	55
II.3 FUNCIONES	
III.3.1 POLINIZACIÓN Y MORFOGÉNESIS	63

CAPÍTULO IV DEFENSA VEGETAL. INHIBICIÓN DE POLIGALACTURONASAS PRODUCIDAS POR PATÓGENOS E INSECTOS

V.1 FUNCION DE LAS PGIPS EN PATOGÉNESIS	65
V.2 PRUEBAS PRELIMINARES DE LABORATORIO, PGIP PRODUCIDA POR <i>Medicago sativa</i> VS PG PRODUCIDA POR <i>Lygus hesperus</i>	75

CAPÍTULO V ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN PRESENTADA

V.1 ANÁLISIS	78
V.2 IMPORTANCIA	82
CONCLUSIONES	86
PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN	87
BREVIATURAS	96
BIBLIOGRAFÍA	98

INTRODUCCIÓN

Los humanos dependemos de las plantas de una o de otra forma. La agricultura siempre será la base de nuestra supervivencia. Toda vida necesita afirmarse frente a la misma tendencia de las otras existencias. En la escala vital conviven y se confrontan entes biológicos y sus depredadores implacables. No podía ser excepción lo referente al cultivo de la tierra. En este milenar trabajo, el hombre ha luchado incansablemente defendiendo a las plantas que cultiva de sus enemigos sempiternos, haciendo posible su permanencia. La ciencia ha aliviado en cierta forma esta heroica contienda. Hoy, con la investigación científica, se analizan las interacciones entre las plantas y sus patógenos, se proponen medios para ganar el combate a favor de la planta y por ende, a favor del ser humano.

Patógenos e insectos, tienen las "armas" necesarias para atacar a las plantas que los hospedan, pero como ya lo afirmamos, los miembros del Reino Plantae poseen y desarrollan también, "armas" para defenderse. Fomentar estas defensas gracias a la ingeniería genética, permite al hombre utilizar opciones que indudablemente le permitirán mejorar variedades de productos agrícolas.

Una de las "armas" más importantes que portan los agentes patógenos y los insectos cuando atacan a las plantas son las enzimas pectinasas, ya que destruyen barreras esenciales para poder acceder a los nutrientes de la célula vegetal como la lámina media y la pared celular constituidas de pectina, entre otras sustancias no menos indispensables. La pectina es una matriz heterogénea constituida por distintos tipos de polímeros, cuya molécula base es el ácido galacturónico. Una de las enzimas más importantes en patogénesis es la endopoligalacturonasa (endoPG) producida por un gran número de patógenos facultativos y obligados y reconocida en algunos insectos. Ante dicha enzima, las plantas poseen una protección, los inhibidores glicoproteínicos de poligalacturonasas (PGIPs-polygalacturonase inhibitor proteins).

Para comprender mejor el estudio de las PGIPs se dedican los dos primeros capítulos al estudio de las PGS (poligalacturonasas) desde su reconocimiento, su clasificación, sus características bioquímicas, hasta las funciones que se les han atribuido provocadas tanto por el mismo sistema vegetal como por patógenos e insectos citándose los trabajos realizados sobre este tema desde finales del siglo XVII, hasta mediados del año MM.

Se reserva una parte del capítulo II para explicar el hecho de que las poligalacturonasas mediante su acción, liberan moléculas que dan lugar a reacciones de defensa en la planta, llamadas evocadores. Se debe aclarar aquí, que el término "evocador" se ha utilizado en esta revisión por ser considerado el más adecuado y de significado equivalente al de "elicitador" utilizado en la literatura inglesa. El verbo en inglés "to elicit" tiene su origen del latín "élicere" que significa: hacer aparecer. Aunque el término tiene una raíz latina, se cree más apropiado traducir el verbo como "evocar" evitando así posibles anglicismos.

En el capítulo tercero, se trata de dar una perspectiva, que anhela ser completa, de la información en torno a las PGIPs (poligalacturonase inhibitor proteins), siguiendo el mismo proceso que se desarrolló para las PGs. Tomando en cuenta la información bibliográfica que se adjunta, se exponen de manera sucinta en el capítulo cuarto los resultados preliminares obtenidos en pruebas realizadas en el laboratorio de Fisiología Vegetal y Tecnología de Poscosecha, Pomología en la Universidad de California, Davis, con respecto a la PG producida por la chinche ligus (*Lygus hesperus*; Heteroptera-Miridae) y su antagonista, la glicoproteína inhibidora de poligalacturonasa encontrada en tejidos de distintas variedades de alfalfa (*Medicago sativa*; Fabales-Fabaceae). Estas investigaciones tienen como finalidad elucidar el papel de dicha poligalacturonasa en el daño producido por *Lygus hesperus* así como la interacción con el inhibidor, y la importancia que tiene este último para poder ser utilizado como una característica potencial a seleccionar en el mejoramiento de cultivos de alfalfa.

En el capítulo quinto, se hace un análisis de la información presentada y se señala la importancia que tienen para nuestro país, este tipo de investigaciones.

Como penúltimo apartado, se presentan las conclusiones más importantes sobre este trabajo, mismo que se termina con la cuidadosa investigación bibliográfica de la que a continuación se presenta un resumen y comentarios.

Como una extensión del estudio se anexa el protocolo de un proyecto de investigación como propuesta para resolver una de las incógnitas expuestas en el análisis de la información. El protocolo presentado es sólo un ejemplo de las numerosas investigaciones que se podrían proponer a raíz de esta revisión bibliográfica.

La interesante relación entre las plantas huésped y sus patógenos, ha provocado en la autora una inquietud especial que se traduce en un apasionado estudio sobre estos fenómenos. En el transcurso del mismo, se observó que prácticamente no existe una fuente bibliográfica en español sobre el tema, ni tampoco la relación de una bibliografía de autores extranjeros que pueda satisfacer la necesidad de una información adecuada sobre la materia que se ocupa.

Este estudio bibliográfico realizado en la Universidad de California, Davis, EUA, da una visión de lo que se está realizando actualmente alrededor de la PGs y las PGIPs y lo que se generó en los últimos años acerca de estos inhibidores. Se presenta la transición en los temas de investigación y como, nuevas preguntas, se fueron generando para ir descubriendo el papel de estas glicoproteínas en las interacciones patógeno-planta huésped. Este tema es de gran importancia para el mejoramiento de cultivos y el mantenimiento de frutos en el almacén. El conocimiento de los mecanismos de defensa en las plantas cultivadas, nos abre una posibilidad diferente a la de los pesticidas, para luchar contra los patógenos, ya sea simplemente por selección artificial o por métodos transgénicos.

La autora considera muy importante, hacer una humilde contribución para que los estudiosos e investigadores, puedan obtener sin perder tiempo y esfuerzo, una información útil que logre servirles.

Si esta modesta aportación sirve para nuevos logros, habrá cumplido con los deseos de la autora.

CAPÍTULO I. Enzimas poligalacturonasas (PGs – polygalacturonases)

I.1. Descubrimiento

El interés por conocer los mecanismos por medio de los cuales los organismos patógenos causan enfermedad en las plantas que los hospedan nació alrededor de 1886 cuando De Bary (1886) describió la pudrición causada por *Sclerotinia* sp. en raíces de zanahoria (*Daucus carota*) y otras verduras. De Bary extrajo el jugo de las raíces putrefactas y pudo observar que tejidos sanos se descomponían al contacto con dicho extracto para concluir con ello que los organismos patógenos producen enzimas y toxinas cuando invaden células vegetales (De Bary, 1886).

Para el año de 1905, se les llama enzimas citolíticas a aquellas producidas por bacterias que producen pudrición de raíz. En 1915 se determina que las enzimas pécticas producidas por hongos causan ciertas enfermedades en plantas y en 1940 se relaciona a las celulasas con el desarrollo de enfermedades vegetales. Se sugiere, en 1925, que la bacteria *Pseudomonas tabaci* produce una toxina responsable de la zona clorótica en la enfermedad llamada "wildfire" del tabaco, hipótesis que se confirmó en 1934. Esta toxina fue la primera en ser separada en su forma pura en 1950. Tres años antes se detecta la victorina, toxina producida por *Helminthosporium* sp. La investigación del mecanismo de infección vegetal causada por agentes patógenos llevó al descubrimiento de los reguladores hormonales como la giberelina (1939), el ácido indolacético (final de los 50's), la citoquinina (mediados de los 50s), etc., (Agrios, 1997).

El descubrimiento de las enzimas degradadoras de pared celular vegetal incluyendo en éstas a las poligalacturonasas se hizo posible gracias al previo reconocimiento y

caracterización de las sustancias constitutivas de dicha pared celular. Para la identificación de la actividad enzimática se ha utilizado desde los años 50's la técnica de difusión en placa de agar la cual facilita la preparación de un medio relativamente puro constituido principalmente de un sustrato determinado, ej. el almidón. Entonces, si el extracto obtenido de tejido vegetal infectado o de secreciones provenientes de organismos patógenos degradan dicho sustrato, se concluirá que dicho extracto o tal secreción poseen amilasas (Dingle, *et al.*, 1953).

Las sustancias pécticas se han definido como el material extraído de paredes celulares vegetales por medio de quelantes de Ca^{2+} como el oxalato de amonio, EDTA, EGTA, etc. Las enzimas que degradan este sustrato extraído se llaman pectinasas (Buchanan, *et al.*, 2000).

1.2. Sustrato, clasificación y características bioquímicas

La barrera externa de una célula vegetal es la pared celular constituida por polisacáridos a diferencia de las células animales donde la membrana fosfolipídica es el punto de contacto con el medio extracelular. Por lo tanto, un modo de ataque de un patógeno vegetal es la secreción de enzimas que degraden los polisacáridos que integran dicha pared celular. Así una característica principal en patología de plantas es la alteración o degradación de componentes estructurales del huésped durante la infección. Ésto es particularmente cierto en enfermedades causadas por parásitos facultativos y obligados, aunque el grado de importancia del papel de estas enzimas en enfermedades causadas por los parásitos del segundo tipo no está claro. Se sabe que ciertos hongos micorrízicos producen pectinasas; en este caso se esperaría que la producción de dichas enzimas esté controlada adecuadamente para prevenir la muerte de la célula hospedera debido a una maceración extrema de las paredes celulares (Bateman y Bashman, 1976).

La pared de la célula vegetal es una estructura dinámica que cambia a lo largo del ciclo de vida celular. Este componente de la célula vegetal posee diversas funciones como la determinación de la porosidad y por ende la modulación del pH e intercambio iónico. Regula la adhesión entre células mediante la lámina media y reconoce ciertas moléculas que alertan a la planta de la invasión de organismos simbiotes, patógenos e insectos. Está constituida por las siguientes capas:

- 1) Lámina media, constituida por lignina y pectinas formando la interfase entre las paredes primarias de células vecinas. Es formada durante la división celular y su crecimiento se coordina de acuerdo a la expansión celular.
- 2) Pared primaria, constituida por celulosa y pectinas, así como también hemicelulosas y proteínas estructurales; esta pared nace en la placa media durante la división celular y su superficie se incrementa durante la expansión celular, a veces hasta 100 veces su tamaño inicial.
- 3) Pared secundaria, constituida por celulosa, pectinas, hemicelulosa, proteínas estructurales y lignina, presente en fibras y otros componentes celulares en el xilema; esta última pared es elaborada durante la diferenciación de las células, hacia el interior de la célula a partir de la pared primaria (Agrios, 1997; Buchanan, *et al.*, 2000).

Dentro de las macromoléculas que forman parte de la pared celular, podemos empezar mencionando a la celulosa, componente principal de andamiaje de todas las células vegetales, siendo de un 15% a 30% del peso seco de las paredes primarias y un porcentaje mayor en las paredes secundarias. Otra macromolécula es la calosa producida por los elementos de los tubos cribosos en angiospermas, en sólo algunos estadios de desarrollo, en respuesta a lesiones, herbivoría o penetración de organismos patógenos. Los glucanos

interconectores o hemicelulosas son moléculas que se encuentran unidas por puentes de hidrógeno a las microfibrillas de celulosa y que poseen un papel importante durante la expansión celular. Por último la matriz de pectina es una mezcla de polisacáridos heterogéneos, ramificados, abundantes en ácido-D-galacturónico. Los dos constituyentes principales de la pectina son el homogalacturonano (HGA) y el ramnogalacturonano (RGI). El HGA es un polímero homogéneo de 200 unidades de (1-4) α -ácido-D-galacturónico, cuya longitud es de 100 nm. Este polímero tiene dos variantes: el xilogalacturonano, en donde la mitad de las unidades de ácido-D-galacturónico están sustituidas por una α -D-xilosa en su posición O-3, y el ramnogalacturonano II, que es un homogalacturonano complejo sustituido por grupos distintos encontrándose entre ellos la apiosa y el ácido acérico. El RGI es un polímero heterogéneo cuyas unidades disacáridas (1-2) α -L-ramnosa-(1-4)- α -ácido-D-galacturónico se repiten a lo largo de éste y se desconoce su longitud. También forman parte de la pared celular vegetal proteínas estructurales como la extensina y sustancias aromáticas -como el ácido ferúlico y el ácido p-coumárico- en paredes no lignificadas de algunas especies incluídas en las Familias Chenopodiaceae y Commelinaceae (Buchanan, *et al.*, 2000).

Por otro lado, la naturaleza de las "armas" utilizadas por los patógenos vegetales, para degradar la pared celular anteriormente descrita, puede ser mecánica o química. La fuerza mecánica utilizada por las hifas de ciertos patógenos al penetrar los tejidos vegetales es la menos importante en el proceso de infección, aunque algunos patógenos ejercen una presión considerable al formar esporocarpos como los peritecios y los picnidios que al crecer rompen los tejidos vegetales. Dentro de las "armas" químicas existen las enzimas, toxinas, reguladores de crecimiento, polisacáridos y supresores de respuesta de defensa de la planta huésped; todos estos compuestos pueden ser constitutivos o inducibles y son los más importantes en el desarrollo de una enfermedad vegetal. Las enzimas desintegran parte de los

componentes estructurales de las paredes celulares vegetales, rompen sustancias alimenticias inertes en la célula y afectan los componentes del protoplasto directamente interfiriendo con sus sistemas funcionales. Las toxinas actúan directamente en los componentes del protoplasto e interfieren con la permeabilidad de sus membranas y su función. Los reguladores del crecimiento tienen un efecto hormonal en las células, incrementando o disminuyendo su habilidad de dividirse o expandirse. Parece ser que los polisacáridos juegan un papel sólo dentro de enfermedades que atacan al sistema vascular, en donde interfieren pasivamente en la translocación de agua dentro de la planta, sin embargo, pudieran ser también tóxicos (Agrios, 1997).

Nos interesan en este momento, las enzimas que depolimerizan sustancias pécticas y que fueron clasificadas por Demain y Phaff (1957) y por Deuel y Stutz (1958) como glucosidasas cuyas actividades específicas dependen del nivel de esterificación del sustrato y de si atacan por los extremos o en forma azarosa al polímero. Sin embargo, Albersheim, *et al.* (1960b) descubrieron que una preparación de una pectinasa comercial se anclaba en forma transeeliminativa a la unión glucosídica α -1-4. Este descubrimiento fue acompañado por varias publicaciones que demostraban el mecanismo de transeeliminación en enzimas que depolimerizan pectina. Por lo tanto, fue necesaria una nueva clasificación, especialmente cuando se descubrió que las liasas (transeeliminadas) o por lo menos las liasas del ácido péctico podían ser clasificadas por su preferencia hacia un sustrato más o menos metoxilado y por si atacan el polímero en su extremo o en diferentes sitios. Esta nueva clasificación fue introducida por Neukom (1963), quien subdividió en ocho grupos a todas las enzimas que rompen las uniones glucosídicas α -1-4 que unen los monómeros galacturónidos de las sustancias pécticas. El prefijo endo o exo designa el anclaje azaroso o terminal. Estas enzimas pueden ser clasificadas a su vez según su pH óptimo, su inhibición o activación por

cationes, estabilidad y para las exoenzimas si es que atacan el extremo reductor o el no reductor y además el grado de polimerización del producto final (Neukom, 1963).

Bateman y Millar (1966) notan la necesidad de proveer de una clasificación actualizada para las glucosidasas y liasas pécticas ya que información nueva se generó a partir de 1957, sin embargo basan su clasificación en el esquema dado por Demain y Phaff (1957). Utilizan básicamente tres criterios que son: a) el mecanismo por medio del cual se desliga la unión glucosídica α -1,4; b) la preferencia de la enzima por un sustrato determinado; c) el punto de ataque donde ocurre la ruptura dentro de la cadena péctica (Tabla 1).

Las enzimas poligalacturonasas catalizan el rompimiento de las uniones α -(1-4) de galacturonano (Fig. 1). La pectato liasa cataliza el rompimiento de la misma unión α -(1-4) pero por medio de una eliminación beta y no por medio de un mecanismo hidrolítico. Las pectato liasas no han sido identificadas en frutos pero sí en microorganismos, aunque se ha encontrado un ARN mensajero en pólen de la flor del jitomate con secuencia similar a una pectato liasa de origen fúngico (Wing, *et al.*, 1990)

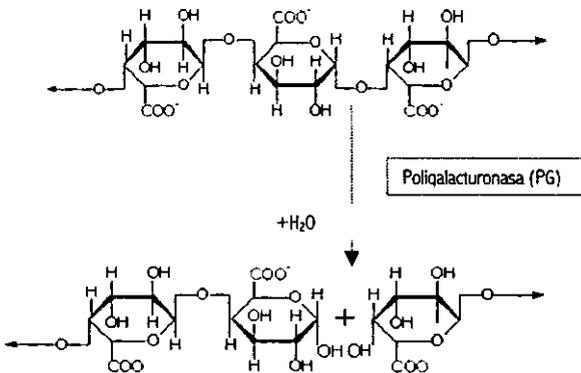


Fig. 1. Degradación del ácido péctico (α -1,4-ácido galacturónico) llevada a cabo por la poligalacturonasa.

Tabla 1. Clasificación de glucosidasas y liasas pécticas (Bateman y Millar, 1966).

A. Escisión hidrolítica de la unión glucosídica α -1,4 de sustancias pécticas (Poly- α -1,4, galacturónido glucanohidrolasa-

3.2.1.15)

1. Mecanismo azaroso de hidrólisis

a. Pectina disociada en preferencia al ácido péctico.....(endopolimetilgalacturonasa).....(endoPMG)

b. Ácido péctico disociado en preferencia a la pectina.....(endopoligalacturonasa).....(endoPG)

2. Mecanismo terminal de hidrólisis

a. Pectina disociada en preferencia al ácido péctico.....(exopolimetilgalacturonasa).....(exoPMG)

b. Ácido péctico disociado en preferencia a la pectina.....(exopoligalacturonasa).....(exoPG)

B. Escisión *trans*-eliminativa de la unión glucosídica α -1,4 de sustancias pécticas (Poly- α -1,4-D-galacturónido liasa-

4.2.99.3)

1. Mecanismo azaroso de degradación *trans*-eliminativa

a. Pectina disociada en preferencia al ácido péctico.....(endopectinmetil-trans-eliminasa).....(endoPMTE)

b. Ácido péctico disociado en preferencia a la pectina.....(endopoligalacturonato-trans-eliminasa).....(endoPGTE)

2. Mecanismo terminal de degradación *trans*-eliminativa

a. Pectina disociada en preferencia al ácido péctico.....(exopectinmetil-trans-eliminasa).....(exoPMTE)

b. Ácido péctico disociado en preferencia a la pectina.....(exopoligalacturonato-trans-eliminasa).....(exoPGTE)

La endo-D-galacturonasa (poli-1,4- α -D-galacturónido) glucanohidrolasa, cataliza de manera azarosa la separación hidrolítica de las uniones glucosídicas internas α -1,4 en las cadenas D-galacturonano de las sustancias pécticas. En 1978 poco se sabía acerca del mecanismo enzimático y el modo en que la enzima se unía al sustrato y el carácter de los grupos activos que participan en la reacción catalítica (Rexová-Benková y Mracková, 1978).

La poligalacturonasa de *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* consiste en una β hélice cuyo dominio está constituido por diez vueltas y dos bucles que se organizan en forma de túnel; parece ser que el sitio activo de la enzima se encuentra entre estos dos bucles. La estructura cristalográfica de la poligalacturonasa de *E. carotovora* ssp. *carotovora* se presenta en la Fig. 2. (Pickersgill, et al., 1998).

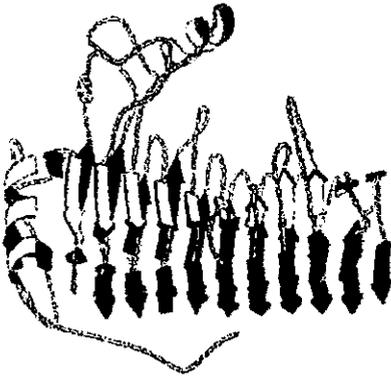


Fig. 2. Representación esquemática de la estructura de la poligalacturonasa (PehA) de *E. carotovora* ssp. *carotovora*. Las láminas paralelas β PB1, PB1a, PB2 y PB3, aparecen en color amarillo, azul, verde y rojo, respectivamente. La estructura posee diez vueltas completas en una arquitectura β -hélice.

La PG del fruto del jitomate es modificada co- y postranslacionalmente, incluyendo el procesamiento secuencial del extremo N-terminal hidrofóbico, la glucosilación diferencial y el procesamiento del extremo carboxilo. Todas las PGs clonadas hasta ahora poseen un extremo N hidrofóbico con una secuencia determinada que permite dirigir a la proteína hacia

el lumen del retículo endoplásmico y presumiblemente hacia la pared celular (DellaPenna y Bennett, 1988).

Se sabe que los patógenos son capaces de producir poligalacturonasas con puntos isoeléctricos ácidos, neutrales y básicos, como en el caso de *Colletotrichum gloeosporioides*. El peso molecular de las enzimas también varía, por ejemplo, la endopoligalacturonasa de *C. lindemuthianum* tiene un peso molecular de 39 kD. Su síntesis es inducida por pectato, su pH máximo es 5.0 y su actividad es reducida a pHs mayores a 6.0. No se sabe si las diferencias bioquímicas entre poligalacturonasas determinan la habilidad de ciertos patógenos para invadir tejidos vegetales. Sin embargo, se sugiere que PGs con puntos isoeléctricos elevados son una característica de hongos patogénicos muy especializados. Hay una gran variedad de isoenzimas con actividad PG en relación a la estabilidad, la especificidad, el pH óptimo, la preferencia de sustrato, la cinética de degradación, los tipos de oligosacáridos liberados y su inducción en la planta huésped (Bailey, *et al.*, 1992).

Con base en el concepto estructural de la pared celular primaria, parece razonable que las enzimas pécticas tengan una función vital en la descomposición de la pared celular. Particularmente, las endopoligalacturonasas y liasas son capaces de atacar paredes celulares, desmembrando su estructura y dejando a otros polímeros de la pared expuestos a la hidrólisis enzimática (Bateman y Bashman, 1976).

Los patógenos vegetales producen una gran variedad de enzimas capaces de degradar los diversos componentes de la pared celular. El papel de las enzimas que atacan la matriz péctica ha sido el único mecanismo establecido como convincente dentro del proceso de patogénesis. En la década de los ochentas se demostró que los fragmentos liberados debido a la acción degradadora de la pared celular por parte de las enzimas provocan una reacción de defensa y que bacterias de gran acción pectolítica como *Erwinia chrysantemi* y

E. carotovora pueden ser sujetas a transformaciones genéticas, dando una oportunidad de conocer más acerca del "sistema inmune vegetal" (Collmer y Keen, 1986).

Se puede señalar la ocurrencia de los siguientes pasos durante la interacción de un patógeno pectolítico y un potencial hospedero: a) el patógeno invasor posee genes estructurales que codifican enzimas pécticas con propiedades catalíticas y físicas, b) los genes se expresan de una manera característica en el tejido infectado, c) las enzimas son exportadas del citoplasma del patógeno hacia el tejido de la planta hospedera, d) en ciertos tejidos las enzimas encuentran inhibidores o sustratos protegidos, e) en otros tejidos las enzimas se encuentran activas anclándose a polímeros estructurales en la pared celular primaria y la lámina media, facilitando la penetración y colonización del patógeno. Los fragmentos pécticos liberados por estas enzimas pueden tener un efecto en la interacción, incluyendo la aparición de reacciones de defensa por parte de la planta hospedera (Collmer y Keen, 1986).

Como se explica en la Tabla 1, la exopoligalacturonasa depolimeriza pectina al hidrolizar la cadena de polisacáridos empezando por su extremo no reductor y es responsable de la degradación sucesiva de los fragmentos producidos por la acción previa de la endopoligalacturonasa (Brownleader, *et al.*, 1999). Varias frutas contienen tanto endo como exopoligalacturonasas, incluyendo la pera, melocotón, pepino y papaya. La actividad exopoligalacturonasa fue purificada en una variedad de melocotones (*Prunus persica*) y se observó que consta de dos enzimas determinadas por cromatografía de intercambio iónico. Estas exopoligalacturonasas con una masa molecular de 66kDa, se detectaron en niveles bajos durante el desarrollo del fruto y su abundancia se incrementó durante la maduración (Fischer y Bennett, 1991). También existen exoPGs involucradas en el fenómeno de abscisión

en plantas, como se explica en la sección I.3.4 de este estudio (Sexton y Roberts, 1982), y en el de polinización (Emerson, 1938).

Se ha reportado que hongos fitopatógenos producen exopoligalacturonasas. Las exopoligalacturonasas poseen una gran importancia ya que degradan los oligogalacturónidos que son evocadores activos liberados por las endoPGs y generalmente, no son inhibidas por PGIPs (Cervone, *et al.*, 1990). Uno de los primeros trabajos que tratan de elucidar el papel de estas enzimas en patogénesis, es el trabajo de García-Maceira, *et al.*, (2000), que da a conocer como dos mutantes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* con el gen *pgx4* inactivado que normalmente codifica para una exopoligalacturonasa, se mostraron tan virulentos en las plantas de jitomate como la cepa silvestre. Con ello concluyeron, que por lo menos para la interacción *Lycopersicon esculentum* – *F. Oxysporum* la exopoligalacturonasa no es esencial para desarrollar patogénesis (García-Maceira, *et al.*, 2000).

Quisiera hacer notar la siguiente observación generada a través del estudio de la bibliografía consultada. Se encontró en la literatura, principalmente en artículos anteriores al año 1991, que la mayoría de los autores usan el término "poligalacturonasas" para referirse particularmente a la endopoligalacturonasa, ya que el papel de esta enzima ha sido más estudiado y aparenta ser de mucho más relevancia que el papel de la exopoligalacturonasa en fisiología y patología vegetal, además, la actividad exopoligalacturonasa depende hasta cierto punto de la previa actividad enzimática de la endopoligalacturonasa. Sólo cuando se habla de la exopoligalacturonasa se agrega el prefijo correspondiente. En trabajos publicados en los últimos 10 años, se nota un mayor cuidado en diferenciar las exoPGs de las endoPGs, ya que la investigación amplió el campo de estudio.

1.3. Funciones

1.3.1. Abscisión

Las poligalacturonasas están presentes también en el fenómeno de abscisión que ocurre como resultado de una pérdida de adherencia entre células vegetales vivas. Este proceso conlleva la descomposición de la pared celular en dos o tres capas celulares extendidas a lo largo de un plano que atraviesa el órgano del que se ha de despojar la planta. Durante la fase de separación la fuerza tensora en la zona de abscisión disminuye como resultado de la degradación de la sustancia intercelular (lámina media). Las enzimas degradadoras de pared implicadas en este proceso son la celulasa y la poligalacturonasa. La celulasa es sintetizada *de novo*, en cambio, la poligalacturonasa podría ser sólo activada durante la abscisión (Sexton y Roberts, 1982).

El tipo de actividad poligalacturonasa asociada con la abscisión foliar en especies del género *Citrus* es exopoligalacturonasa. El catión Ca^{2+} está implicado también en este proceso ya que sale de las células debido al aumento de la permeabilidad de la pared conforme la separación celular toma lugar. El etileno acelera la fase de separación e incrementa la actividad de las dos enzimas hidrolíticas ya mencionadas, al estimular su secreción hacia la pared celular. La fractura final depende del desarrollo de las fuerzas mecánicas necesarias para separar las células y romper los vasos del xilema (Sexton y Roberts, 1982).

I.3.2. Dehiscencia

También se ha asociado a las PGs con la dehiscencia de anteras y vainas (Meakin y Roberts, 1991). La dehiscencia de vainas es muy similar al proceso fisiológico de abscisión ya que ocurre en una zona determinada en la vaina y es el resultado de la separación de una capa de células especializadas no lignificadas, llamada zona de dehiscencia. La lámina media se deteriora y se pierde pectina durante la separación celular, además hay un incremento de actividad endoglucanasa. Aunque la actividad enzimática de la PG no ha sido demostrada definitivamente, se han identificado genes que podrían codificar PGs (Jenkins, *et al.*, 1996).

La modificación de la pared celular está implicada en casi todos los estadios de desarrollo de la planta y se muestra evidente que la presencia de enzimas que degraden la pared celular se expresa en un gran número de estas etapas, incluyendo maduración, abscisión, dehiscencia, patogénesis y expansión celular. La existencia de genes múltiples que conllevan una función similar en cada etapa del desarrollo de la planta, provee las bases de una regulación de la expresión génica muy compleja dependiente de estímulos durante el desarrollo y por parte del ambiente y de la especialización de la función bioquímica del producto de cada distinto gen.

I.3.3. Maduración de ciertos frutos de importancia económica

La maduración del jitomate está asociada con numerosos cambios fisiológicos y bioquímicos. Entre estos se encuentran la degradación de clorofila, producción de compuestos saborizantes y aceites esenciales, incremento en la síntesis del etileno, solubilización de la pared celular y ablandamiento del fruto. Este último cambio es uno de los más característicos, el cual ha sido asociado con el incremento de actividad de enzimas

degradadoras de pared celular, dentro de las cuales la poligalacturonasa es considerada como la principal enzima hidrolítica responsable de la pérdida de firmeza del tejido (Grierson, *et al.*, 1981; Hobson, 1964), aunque parece ser que las celulasas también están involucradas (Dickinson, 1964). El fruto del jitomate posee por lo menos dos isoenzimas de poligalacturonasa cuya interconversión parece ocurrir (Tucker, *et al.*, 1981) y cuyo incremento en actividad podría deberse a una síntesis *de novo* durante la maduración (Tucker y Grierson, 1982). La actividad de las isoenzimas está separada temporalmente durante el transcurso de la maduración; Crookes (1983) sugiere que la PG1 es responsable de iniciar la disrupción de la pared degradando la lámina media. En un estado más avanzado de desorganización, la PG2 ataca la pared celular primaria.

La proteína PG y su actividad enzimática se incrementan dramáticamente al final de la maduración. La proteína PG ha sido aislada de jitomates maduros y se ha encontrado que está asociada con las paredes celulares del fruto (Tucker y Grierson, 1982). Bird, *et al.*, (1988) encuentra a diferencia de Tucker, *et al.*, (1981) que existen tres isoenzimas con actividad poligalacturonasa, (PG1, PG2a y PG2b) y piensa que están estructuralmente relacionadas. La diferencia exacta entre las tres isoenzimas no es clara. Sin embargo, es posible que resulten de la modificación pos-translacional de un solo polipéptido (Bird, *et al.*, 1988). El ARN mensajero que codifica para la poligalacturonasa es producido en frutos maduros, no se produce en jitomates inmaduros, hojas ni raíces (Mauders, *et al.*, 1987).

También se ha encontrado actividad poligalacturonasa en zonas de abscisión en la planta del jitomate sin saberse aún si esta enzima está relacionada con la isoenzimas presentes en el tejido del fruto. El trabajo de Bird, *et al.*, (1988) describe el aislamiento y caracterización de clones de ADN que codifican PG; los datos presentados son consistentes

con la sugerencia de que sólo existe un gen en el jitomate que codifica la enzima poligalacturonasa.

Para evaluar el efecto de la poligalacturonasa en el proceso de maduración del fruto del jitomate, un grupo de fisiólogos vegetales se dieron a la tarea de inducir la expresión del gen que codifica para la poligalacturonasa en jitomates mutantes "rin" (inhibidor de la maduración). Los frutos "rin" no se ablandan y producen cantidades basales de etileno, no acumulan pigmentos carotenoides y poseen niveles ínfimos de actividad poligalacturonasa, comparándolos con los frutos de plantas silvestres. Se encontró que al producirse PG en dichos mutantes se nota un cambio considerable en la estructura de la pared celular a consecuencia de la actividad de la enzima; sin embargo, niveles altos de PG y la degradación de poliurónidos no son suficientes para inducir el ablandamiento en los frutos "rin", biosíntesis de etileno o acumulación de licopenos (Giovannoni, *et al.*, 1989).

Un estudio muy interesante es el que realizó el grupo de Kramer, *et al.*, (1990), ya que evaluaron en el campo los frutos de plantas de jitomate que expresaban niveles bajos de poligalacturonasa, debido a que dichas plantas fueron transformadas para expresar un gen PG contrasentido. Se observó que cuando la actividad PG se reduce en más de un 90%, los frutos permanecen sin sufrir putrefacción en el campo por más tiempo y que el jugo procesado de los jitomates posee una mayor consistencia y viscosidad. Sin embargo, niveles bajos de PG no afectan la maduración de los frutos en la etapa inicial.

Contrastando con los resultados de Giovannoni, *et al.*, (1989), se ha observado que los oligómeros pectínicos liberados durante la degradación de la pared celular en el proceso de maduración del fruto del jitomate inducen un incremento en la biosíntesis de etileno a corto plazo, un incremento en etileno durante el climaterio en discos de tejido obtenidos de frutos maduros y verdes en un largo plazo y la aparición de pigmentos en la superficie de los discos

(Campbell y Labavitch, 1991). Los autores de este estudio basan la autenticidad de sus resultados en que el papel de los oligómeros en la inducción del proceso de maduración se debe investigar a nivel tisular; autores como Giovannoni, *et al.*, (1989), no han tomado en cuenta la complejidad anatómica del proceso de maduración (Campbell y Labavitch, 1991). Apoyando el trabajo de Campbell y Labavitch (1991), Melotto, *et al.*, (1994), encuentra que oligómeros producidos por la actividad poligalacturonasa durante el proceso de maduración del jitomate son biológicamente activos y tienen la función de reguladores endógenos promoviendo la producción de etileno en discos de tejido extraído del pericarpo.

En algunos frutos como la manzana, chile, zarzamora, pèrsimo y fresa no se ha encontrado a la poligalacturonasa como la enzima responsable de la solubilización de la pectina durante la maduración. Por lo tanto se hace necesario preguntarse como es que estas frutas degradan la pectina. Otros estudios con frutos mutados para el gen de la poligalacturonasa muestran que esta enzima es insuficiente para el desarrollo del proceso de maduración, con estas bases se sugiere el estudio más a fondo de otras enzimas como la β -galactosidasa (Cutillas-Ilturralde, *et al.*, 1993).

Analizando la literatura que existe sobre la función de las poligalacturonasas y su importancia en los procesos fisiológicos y patológicos, se puede observar que en un principio se le otorgaba toda la importancia a la endopoligalacturonasa y conforme los estudios se hicieron más arduos y extensos, se llegaron a obtener resultados que muestran que la PG es importante en el proceso de maduración, pero necesita complementar su acción con otras enzimas de igual importancia. En el artículo de Lazan, *et al.*, (1995) se evidencia la interacción de la PG, la β -galactosidasa y la pectinesterasa en el proceso de ablandamiento y modificación de la pared celular durante la maduración de la papaya (*Carica papaya* L. variedad Eksotika).

Con todo lo anterior, Hadfield y Bennett (1998) concluyen que la actividad PG no es suficiente o necesaria para el ablandamiento de ciertos frutos, ya que los resultados obtenidos con jitomates transgénicos a los cuales se les han alterado los niveles de PG son consistentes con la hipótesis de que la disociación péctica mediada por PG no contribuye al ablandamiento de frutos en las primeras etapas del proceso, pero si contribuye significativamente en el deterioro del tejido en las etapas tardías del proceso de maduración. Se sugiere que los genes expresados en las zonas de abscisión y los expresados durante la maduración de frutos provienen de líneas divergentes filogenéticas ya que los resultados de Taylor, *et al.*, (1990) muestran que los anticuerpos desarrollados en contra de una PG del fruto del jitomate no reaccionan con la PG extraída de zonas de abscisión de hojas o ARNm de la misma planta de jitomate.

I.3.4. Organogénesis

También se ha localizado poligalacturonasa durante el surgimiento de raíces laterales en *Allium porrum*. Durante la formación de raíces laterales, la presión mecánica ejercida por los primordios induce la producción de enzimas líticas por parte de las células corticales de la raíz madre. Los factores mecánicos y los enzimáticos determinan el surgimiento apropiado de las raíces laterales. Peretto, *et al.*, (1992), muestra que la actividad poligalacturonasa se incrementa durante la aparición de raíces laterales y que esta enzima está localizada cerca del ápice y en la periferia del primordio.

Aunque la expresión de la actividad PG en pólen y frutos es alta, también se encuentra en el resto de la planta, sugiriendo que la PG puede tener una función más generalizada. Por ejemplo, acumulación tanto de actividad PG como de ARNm para la PG ha sido detectada en plántulas (Pressey y Avants, 1977; Sitrit, *et al.*, 1996). La localización de ARNm para la PG en

tejidos vegetales en crecimiento y en tejido vascular en desarrollo sugiere que la PG puede estar relacionada con la xilogénesis y la disociación de la pared celular primaria de los miembros del vaso (Hadfield y Bennett, 1998).

1.3.5. Polinización

Se han identificado poligalacturonasas en granos de pólen de diversas plantas, ej. *Zea mays* y *Oenothera organensis* (Brown y Crouch, 1990; Pressey, 1989). La actividad enzimática aparenta ser exclusivamente exoPG. Una vez que el grano de pólen se posa en el estigma debe ser reconocido como compatible o no y de ello depende que se pueda extender el tubo polínico a lo largo del pistilo hasta alcanzar al gametofito femenino y liberar las células espermáticas que llevarán a cabo la fusión de un gameto masculino con la ovocélula y la fusión de un segundo gameto masculino con los núcleos polares (Emerson, 1938).

La autoincompatibilidad gametofítica en un gran número de angiospermas está controlada por genes que se expresan en el grano de pólen (Emerson, 1938). La exoPG producida por el tubo polínico degrada las paredes celulares de las células estilares permitiendo la penetración suministrando precursores de la pared para el crecimiento del tubo. Alternativamente, la exoPG puede estar actuando en la pared celular del propio tubo polínico, facilitando el crecimiento. Es posible que señales por medio de oligogalacturónidos estén relacionadas con la orientación del tubo polínico hacia el óvulo (Brown y Crouch, 1990).

1.3.6. Toxicidad

Se atribuye una función tóxica por lo menos a la poligalacturonasa de *Colletotrichum lindemuthianum*. La enzima es responsable de la degradación de la pectina y de la misma forma de la muerte de la célula, que comienza con un aumento en la permeabilidad y un daño a la membrana plasmática reconocible en los primeros estadios de la infección (Byrde, *et al.*, 1973). El mecanismo por el que la enzima daña la membrana plasmática no está claro. La posibilidad de que un producto soluble de la degradación enzimática de la pared sea efectivo como agente tóxico para la célula ha sido descartada (Basham y Bateman, 1975).

Existe la hipótesis de que la molécula enzimática interactúa con el protoplasto haciéndole responsable de la actividad tóxica. Cervone y De Lorenzo (1985) aportan evidencia de que la poligalacturonasa producida por *C. lindemuthianum* es absorbida por protoplastos provenientes de la planta del frijol. Su experimento consistió en incubar protoplastos de *Phaseolus vulgaris* con la PG de *C. lindemuthianum* por distintos períodos de tiempo y medir la actividad enzimática presente en el sobrenadante y en el sedimento después de una centrifugación. Los resultados muestran que a mayor tiempo de incubación la actividad enzimática en el sedimento aumenta, indicando que la enzima ha sido absorbida por los protoplastos. Al demostrarse que la PG interactúa con los protoplastos se sugiere la presencia de una proteína (probablemente una PGIP) que se une a la PG a nivel de membrana plasmática (Cervone y De Lorenzo, 1985). Sin embargo, la prueba directa de que la enzima tiene un efecto tóxico es difícil de obtener *in vitro* ya que los protoplastos sólo pueden ser mantenidos en una solución plasmolítica que inhibe la toxicidad de la pectinasa (Bateman y Basham, 1976).

CAPÍTULO II. Poligalacturonasas producidas por patógenos e insectos

II.1. Función en patogénesis

Para 1972 la actividad poligalacturonasa se encontró frecuentemente en levaduras, mohos y bacterias. La poligalacturonasa vegetal no había sido estudiada con detalle en comparación con la poligalacturonasa microbial. Su actividad fue estudiada principalmente *in situ* sin extracción o purificación previa. Hobson (1964) investigó la actividad de extractos de EDTA sódica y encontró actividad poligalacturonasa en varios frutos y vegetales. Ácidos oligogalacturónidos se usaron como sustrato especialmente para el estudio de las enzimas degradadoras del ácido péctico (Voragen, 1972).

Si una depolimerasa es endo o exoenzima no puede ser determinada por la acción degradadora sobre oligogalacturónidos. Sin embargo, la actividad depolimerizante de las "endo" enzimas se incrementa cuando la cadena del polímero es más larga, mientras que las exoenzimas degradan los oligómeros más rápidamente que los polímeros. Ésto puede ser explicado debido a la concentración de uniones glucosídicas accesibles. Las exoenzimas tienen una preferencia por los extremos de la molécula y no por las uniones internas. La información acerca de enzimas degradadoras de pectina altamente esterificada no estaba bien fundamentada y era escasa (Voragen, 1972).

La depolimerasa péctica de origen fúngico más común en los años 70's era la endopoligalacturonasa, siendo al parecer responsable de la fitopatogenicidad de varios hongos: se encontró en *Aspergillus niger* (Cooke, *et al.*, 1976), producida constitutivamente por *Verticillium albo-atrum*, *Aphanomyces euteiches* y *Helminthosporium maydis* cepa T (Bateman y Bashman, 1976).

Para evaluar la contribución de las pectinasas en la patogénesis se deben de satisfacer los siguientes puntos: a) demostrar fisiológica y ultraestructuralmente la actividad de la enzima en tejidos infectados, b) determinar la correlación entre patogenicidad y actividad enzimática en tejidos infectados de variantes naturales tanto de la planta huésped como del patógeno, c) repetir síntomas de la enfermedad por medio de enzimas aisladas o con el uso de organismos genéticamente modificados que produzcan dichas enzimas y, d) modificar organismos patógenos de manera que no produzcan la enzima de interés (Collmer y Keen, 1986).

La endopoligalacturonasa producida por ciertos patógenos ya ha sido evaluada por varios investigadores, considerándosele una enzima importante en el proceso de patogénesis. Es la primera enzima degradadora de la pared celular sintetizada por hongos fitopatogénicos al incubarse con paredes celulares vegetales (Cooper, 1984). Tanto la endopoligalacturonasa de *Aspergillus niger* como oligómeros α -D-galacturonato de un grado de polimerización mayor a cuatro (productos de la hidrólisis de Na-poligalacturonato) producen necrosis en *Vigna unguiculata* Walp (Cervone, *et al.*, 1987a).

El hongo *Verticillium albo-atrum* produce una gama de enzimas degradadoras de pared celular dentro de las cuales, la endopoligalacturonasa y la endopectina liasa (PL) son capaces de aniquilar *in vitro* tejido tanto de papa como de jitomate causando marchitamiento (Cooper, *et al.*, 1978). Las endopectinasas son de gran importancia, ya que los vasos conductores del xilema son ocluidos por geles pécticos en el tejido infectado que son originados debido a la exposición de la lámina media en la zona de punteaduras y placas perforadas (Beckman, 1969). La gelificación provoca el marchitamiento o un flujo vascular reducido (Heale y Gupta, 1972) y puede ser responsable del estrés hídrico característico. Otros síntomas pueden aparecer indirectamente por la degradación de las paredes celulares. Abscisión foliar y

epinastía pueden resultar de la producción de etileno, y clorosis debido a la producción de peróxido de hidrógeno siguiéndole la liberación de la oxidasa de glucosa unida a la pared celular (Mussell y Strand, 1977; Durrands y Cooper, 1988).

Un trabajo que enfatiza la importancia de la poligalacturonasa en la degradación de pared celular es el de Mankarios y Friend (1980). El objetivo de los experimentos descritos en el artículo fue el de determinar el patrón de producción de enzimas degradadoras de pared celular cuando dos patógenos necróticos de la cebolla fueron propagados en presencia de paredes celulares aisladas de cebolla. Las preparaciones enzimáticas provenientes de *Botrytis allii* y *Sclerotium cepivorum* mostraron que la enzima producida mayormente por ambos patógenos fue la poligalacturonasa en todos los estadios de crecimiento. Cada una de las isoenzimas aisladas de tejido de cebolla infectado con *S. cepivorum* causan descomposición de la pared celular y muerte celular en células epidermales (Beck, 1975; Mankarios y Friend, 1980).

Existe también evidencia de que ciertas pectinasas son producidas por esporas de ciertos patógenos durante su germinación (Barash, 1968; Verhoeff y Liem, 1978). Ésto es muy interesante ya que sugiere que la inhibición de dichas pectinasas podría bloquear la germinación y por lo tanto la invasión del patógeno.

En un experimento llevado a cabo por Durrands y Cooper (1988), se produjeron mutantes de *V. albo-atrum* incapaces de producir PG y/o PL, encontrándose que los síntomas no se presentaron al inocular la planta con algunos patógenos mutantes, fueron menos severos o aparecieron tardíamente en las plantas infectadas; aunque los síntomas fueron reducidos, se observó una considerable colonización por parte de los mutantes. Los autores concluyen que las pectinasas, particularmente la PL, son factores virulentos pero no determinantes en patogénesis, ya que la colonización del tejido hospedero se puede llevar a

cabo aún en su ausencia y que la degradación de la pared celular podría requerir de la acción sinérgica de una combinación de enzimas degradadoras de pared celular.

Siguiendo la misma línea de investigación mencionada arriba, se obtuvieron mutantes del patógeno *Cochliobolus carbonum* del maíz incapaces de producir endopoligalacturonasa encontrándose que el grado de patogenicidad del mutante comparado con el patógeno silvestre fue cualitativamente indistinguible, por lo tanto en esta interacción en específico la endopoligalacturonasa no es requerida para lograr la patogénesis. Es posible que la degradación de la pectina no sea crítica en la interacción o que la actividad exopoligalacturonasa detectada sea suficiente (Scott-Craig, *et al.*, 1990).

En el caso de *Botrytis cinerea* se han encontrado hasta trece isoenzimas de poligalacturonasa y el número de isoenzimas que aparecen depende del medio de cultivo en el que crece el hongo y parecen estar reguladas por mecanismos diferentes, como represión por glucosa, inducción por sustrato y represión por producto final (Van Der Cruyssen y Kamoen, 1993).

Mycocentrospora acerina es un patógeno poscosecha de la zanahoria y se ha encontrado que produce poligalacturonasas junto con otro conjunto de enzimas durante el proceso de patogénesis (Le Cam, *et al.*, 1993).

Actualmente se siguen purificando y caracterizando exo y endopoligalacturonas tanto de naturaleza endógena vegetal como producidas por fitopatógenos. Uno de los más recientes trabajos es el de Isshiki, *et al.*, (2000) que publican la purificación de una exoPG y tres endoPGs provenientes de micelio de los patógenos *Venturia pirina* y *Venturia nashicola*. De igual manera hasta el día de hoy continúan los esfuerzos por otorgar la importancia debida al papel de las poligalacturonasas en patogénesis. Se publican tanto artículos que muestran la

poca importancia de las PGs producidas por patógenos como artículos que aseveran la importancia de las poligalacturonasas como el trabajo de Huang y Allen (2000) donde mutantes del patógeno *Ralstonia solanacearum* incapaces de producir poligalacturonasas son menos virulentos que la bacteria silvestre al ser inoculados en plantas de berenjena y de jitomate. Los resultados de dicha investigación sugieren que las poligalacturonasas son necesarias para la rápida colonización del hospedero.

II.2. Pruebas preliminares de laboratorio, poligalacturonasa de *Lygus hesperus*

En 1994 se caracterizó una α -amilasa y una poligalacturonasa en la saliva del insecto *Lygus* sp. (Heteroptera, Miridae); ésto abrió nuevos caminos para la investigación. El insecto *Lygus* sp., conocido como "chinche ligus" en nuestro país, es una plaga primaria muy importante en el ámbito económico, ataca plantas cultivadas como el algodón, ajonjolí, chicharo, papa, sorgo, cártamo, frijol, etc., siendo su huésped preferido la alfalfa. El daño principal ocurre en alfalfares destinados a la producción de semillas, sobre todo al empezarse a formar los botones o yemas florales, evitando la formación de flores, consecuentemente de vainas y cuando la vaina está formada, daña seriamente las semillas. La presencia de una poligalacturonasa en la saliva que el insecto inyecta en el primordio floral se sugiere necesaria para la penetración del estilete y la obtención de sustancias nutritivas que pueden ser alcanzadas solamente al producir una mayor permeabilidad de las células vegetales. La enzima es producida en las glándulas salivales conectadas al estilete, aunque otra poligalacturonasa se presume presente en el primer tercio del intestino del insecto debido a que es necesaria en la digestión (Agblor, *et al.*, 1994).

También se ha encontrado actividad poligalacturonasa en otros insectos. Se ha purificado y caracterizado una endoPG proveniente del intestino de la larva de *Diaprepes abbreviatus* con un punto isoelectrico (pI) de 9.4 y un peso molecular de 44,500 daltones (Doostdar, et al., 1997).

En el laboratorio de Fisiología Vegetal y Tecnología de Poscosecha dirigido por el Dr. Labavitch, en el Departamento de Pomología de la Universidad de California, Davis, se estudia la naturaleza de la poligalacturonasa de *Lygus hesperus*. Se realizan estudios preliminares que puedan esclarecer el papel de esta enzima en el daño observado en plantas huésped de este heteróptero. Existen varios procedimientos para medir la actividad de enzimas que rompen la unión α -1-4 en sustancias pécticas. El ensayo de difusión enzimática en placa de agar, "cup plate assay", como ya se señaló anteriormente, es un procedimiento muy conveniente para cuantificar la actividad enzimática en un número grande de muestras. Se realiza un orificio en la placa de agar, que contiene el sustrato péctico, de aproximadamente 0.15 mm^3 , se pipetea 15 microlitros del extracto enzimático en el orificio y después de un tiempo de incubación (17 a 24 horas) se tiñe el agar con una solución del colorante rojo de rutenio que es afín al sustrato sin degradar. Aquella zona sin teñir indicará entonces actividad enzimática (Bateman y Bashman, 1976). La zona sin teñir es una circunferencia cuyo diámetro es medido con ayuda de un vernier. Claro se encuentra, entonces, que a mayor diámetro la actividad enzimática aumenta y por lo tanto mayor concentración de la enzima en el extracto.

En un principio, la enzima era obtenida gracias a extracción de las glándulas salivales disecando al insecto, tarea que, considerando el tamaño del insecto (6.2 mm de longitud X 3.0 mm de ancho aproximadamente) es más que complicada. Por ello se buscó una manera

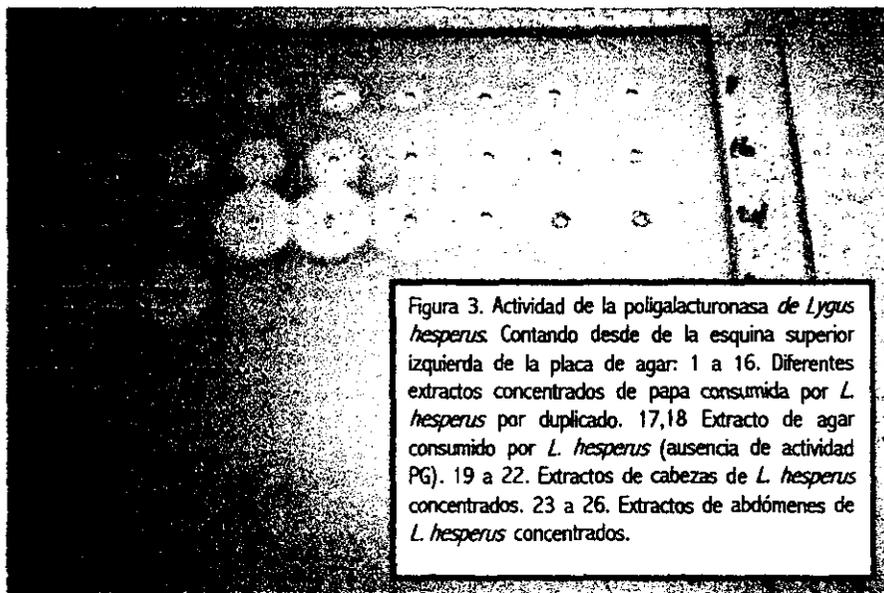
más sencilla de extraer la enzima. Se trató de obtenerla permitiendo que un número considerable de insectos, -de ambos sexos e instares diversos-, se alimentaran de distintos materiales, esponjas sintéticas, agar y tejidos vegetales (tubérculos y raíces primarias). Se obtuvieron extractos de los diferentes tratamientos usando una solución amortiguadora de acetato de sodio pH 5, 0.1M, 3M NaCl, 0.1M 2-mercaptoetanol, 5% p/v polivinilpirrolidona.

De todos los tratamientos, se prefirió utilizar el tubérculo de la papa para la extracción de la poligalacturonasa del insecto *Lygus hesperus* debido a que el tejido se presta a una homogeneización más fácil, el insecto se alimenta de manera satisfactoria del tubérculo y al realizarse pruebas de actividad enzimática en placas de agar, la actividad poligalacturonasa obtenida era adecuada para su análisis (alrededor de 20 mm de diámetro). El sentido común parece indicar que no se esperaría la presencia de una PGIP que inhibiera la PG de *L. hesperus* en el tubérculo de la papa ya que dicho órgano no se encuentra expuesto al daño directo de este insecto. Sin embargo, durante la investigación bibliográfica hecha para esta revisión, se encontró un artículo donde se publica la presencia de una PGIP en tejidos de *Solanum tuberosum*; en el artículo nunca se menciona de qué tejidos se ha extraído la enzima, pero en las pruebas que realizan los autores de la publicación se utilizan extractos enzimáticos de *Verticillium dahliae*, *Aspergillus alliicus*, *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani*, por lo tanto se infiere que se utilizó principalmente el tubérculo de la papa, ya que es un órgano que es atacado por este tipo de patógenos (Glinka, et al., 1996).

Para asegurar que la PGIP de la papa no inhibiera en cierto grado la PG de *L. hesperus*, se llevaron a cabo en el laboratorio algunas pruebas, las cuales consistieron en mezclar PG de *L. hesperus* obtenida de un extracto de agar (el agar fue mezclado con 0.5 g ácido poligalacturónico y presentado como alimento a los insectos) y extracto de papa realizándose una prueba de actividad enzimática en placa de agar con los correspondientes

controles. Se observó que la PG de *L. hesperus* proveniente del agar no fue inhibida, sino incrementada por el extracto de papa, lo que sugiere que en el tubérculo debe existir algún catión o compuesto que sirve como cofactor y que incrementa la actividad PG. En cambio, como se esperaba, la PGIP del tubérculo inhibió la actividad de la PG producida por *B. cinerea*.

Después de las pruebas anteriores, se continuó extrayendo la poligalacturonasa de *L. hesperus* por medio del tubérculo de la papa. Los extractos se sujetaban a diálisis y concentración para después poder correrse en columnas cromatográficas y posteriormente analizar la actividad enzimática de las fracciones recolectadas (Fig.3 y 4).



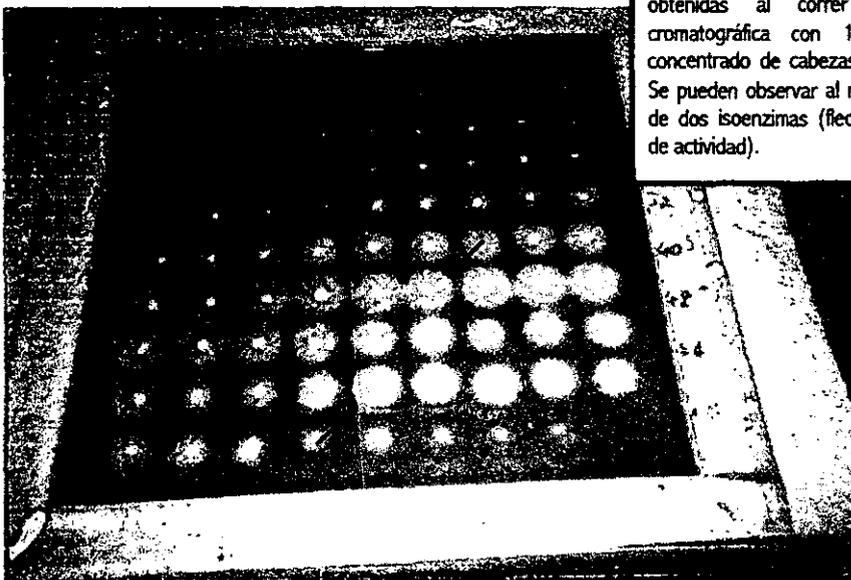


Figura 4. Localización de actividad poligalacturonasa en las fracciones obtenidas al correr una columna cromatográfica con 1ml de extracto concentrado de cabezas de *L. hesperus*. Se pueden observar al menos la actividad de dos isoenzimas (flechas indican picos de actividad).

II.3. Aparición de mecanismos de defensa vegetal

II.3.1. Fitoalexinas

Las plantas poseen una gran variedad de mecanismos de defensa en contra de los microorganismos. Un mecanismo muy bien identificado es la producción de fitoalexinas en el sitio de infección. Las fitoalexinas poseen una gama amplia de propiedades antibióticas y no se encuentran en tejidos sanos. La acumulación de fitoalexinas puede ser desencadenada por moléculas, llamadas evocadores ("elicitors"), producidas por microorganismos patógenos,

pero de la misma manera puede ser por medio de factores abióticos como la luz ultravioleta, adición de metales pesados, sales o exposición a ciclos de congelamiento-descongelamiento. En 1981, Hahn y colaboradores publican que el evocador de fitoalexina en *Glycine max* variedad Wayne es un fragmento de la pared celular vegetal. Ésto les lleva a proponer que quizá una enzima degradadora de la pared celular vegetal producida por un patógeno es la responsable de la liberación de dichos evocadores y en consecuencia, provoca la producción de fitoalexina. Ésto sugiere que las plantas pueden detectar y responder defensivamente ante el ataque de patógenos; no obstante, ésto también indicaría que la compleja estructura de los polisacáridos en la pared celular tiene una razón de ser ya que puede utilizarse para codificar mensajes biológicos (Hahn, *et al.*, 1981).

Varios estudios demuestran que los productos de las pectinasas evocan la síntesis de fitoalexina en algunos sistemas vegetales. La actividad del evocador se correlaciona con la actividad pectinasa y se pierde cuando la enzima es inactivada por medio del calor. Los evocadores más efectivos para el caso de *Ricinus communis* son trímeros de oligogalacturónidos α -1,4 (Jin, y West, 1984) y dodecámeros (Nothnagel, *et al.*, 1983) o 4,5 decámeros insaturados en el caso de la soya (Davis, *et al.*, 1986). Oligogalacturónidos más pequeños que un nanómero son inactivos en el frijol; aquellos más pequeños que un octómero y mayores que un dodecámero pueden inhibir parcialmente la actividad evocadora del 4,5 decámero insaturado en cotiledones de soya. La actividad del evocador es disminuida por metilesterificación o reducción de grupos carboxilo, indicando que el evocador debe estar cargado negativamente (Davis, *et al.*, 1986).

Una observación muy importante es que la actividad evocadora de la respuesta defensiva vegetal está asociada con oligogalacturónidos de cierto tamaño preparados por diferentes métodos y materiales, y que la actividad evocadora de dichos oligogalacturónidos

se destruye por una subsecuente digestión enzimática de los enlaces α -1,4 (Davis, *et al.*, 1986).

Collmer y Keen (1986) notan la confusión que está relacionada con el papel que juegan los evocadores, ya que existe evidencia que pone en tela de juicio si los evocadores de una determinada respuesta de defensa son fragmentos de la pared celular liberados por la acción de la enzima o la enzima misma. Los autores señalan que el evocador termoestable encontrado por otros investigadores puede ser una enzima. El papel de los evocadores, en general, necesita ser estudiado más a fondo, ya que todavía, por ejemplo, no se puede reconciliar la presencia de evocadores con el éxito de patógenos pectolíticos como *E. carotovora* que son sensibles a las fitoalexinas producidas por sus hospederos. Es posible, añaden estos autores, que la importancia de los evocadores oligogalacturónidos radique en su acción combinada con otros factores, y aquí es donde los inhibidores glicoproteínicos de poligalacturonasas quizá representan una pieza en el rompecabezas.

La presencia de moléculas evocadoras en las plantas fue observada en experimentos donde tallos de frijol sujetos a un tratamiento de congelación-descongelación se pusieron en contacto con tallos sanos de la misma planta resultando una acumulación de fitoalexinas en este último tipo de tallos (Hargreaves y Bailey, 1978). Más tarde, el material evocador fue observado en extractos de frijol (Hargreaves y Selby, 1978), tejido de soya (Hahn, 1981) y paredes celulares aisladas de células de soya (Hahn, *et al.*, 1981). Las moléculas evocadoras activas fueron identificadas subsecuentemente, como oligómeros de α -(1-4) uniones entre residuos de ácido galactosilurónico (Hahn, *et al.*, 1981; Nothnagel, *et al.*, 1983).

Los evocadores oligogalacturónidos podrían ser liberados de homogalacturonano presente en las paredes celulares primarias ya sea por medio de una hidrólisis ácida parcial de las paredes (Hahn, *et al.*, 1981; Nothnagel, *et al.*, 1983) o por la exposición de las paredes

celulares vegetales a pectinasas como la endopoligalacturonasa (Jin y West, 1984; Nothnagel, *et al.*, 1983) o la endopectato liasa (Davis, *et al.*, 1986b y 1986c).

Un material del cual se pueden obtener evocadores y que es más fácil de conseguir comercialmente es el ácido poligalacturónico (APG). Los oligogalacturónidos activos liberados por medio de procesos químicos o enzimáticos resultan ser muy similares, si no idénticos (Davis, *et al.*, 1986b). La mezcla de oligogalacturónidos provenientes de paredes celulares vegetales o de APG es muy heterogénea y contiene oligómeros que van desde un grado de polimerización (DP) de 2 hasta uno de 20 (Hahn, *et al.*, 1993).

Estudios más recientes muestran que los productos urónicos de diferentes isoenzimas con actividad endopoligalacturonasa producidas por *Sclerotinia sclerotiorum* no poseen actividad evocadora de gliceolina similar al atacar paredes celulares de *Glycine max* y quizá ésto se deba a propiedades bioquímicas y fisiológicas propias de cada isoenzima (Favaron, *et al.*, 1992).

II.3.2. Casbeno y etileno

El casbeno ha mostrado propiedades antibióticas en contra *Escherichia coli* y *Aspergillus niger* y dichos resultados sugieren que este diterpeno podría funcionar como una fitoalexina (Sitton y West, 1975). En el año de 1981 se publicó en la revista "Plant Physiology" un estudio que postula a la poligalacturonasa producida por *Rhizopus stolonifer* como evocador de la actividad de la sintetasa del casbeno en *Ricinus communis*. Los autores explican que una indicación de que el evocador del casbeno es una enzima extracelular secretada por el patógeno durante el crecimiento, son los resultados de Stekoll y West (1978)

que muestran la inactivación por altas temperaturas del evocador y sugieren que éste es dependiente de una estructura de proteína nativa para su actividad. La otra indicación proviene del argumento evolutivo que postula que, el evocador de una respuesta de defensa en la planta debe tener un papel esencial para el patógeno, para poder ser reconocido por la planta invariablemente y ser utilizado como señal para la síntesis del casbano (Stekoll y West, 1978).

Para probar experimentalmente que la poligalacturonasa es dicho evocador del casbano, Lee y West (1981), cuantifican la presencia del evocador indirectamente con la actividad sintetasa del casbano y la cantidad de casbano presente en sus extractos de plántulas de *R. communis* y comparan dichas cuantificaciones con la actividad poligalacturonasa presente en los mismos extractos. Realizaron filtraciones en gel y cromatografía de intercambio iónico para la identificación de la poligalacturonasa y la sintetasa del casbano y obtuvieron ambas actividades coincidentes en los perfiles de elución correspondientes a cada columna (Lee y West, 1981). Sin embargo, aquí cabría la duda de si la enzima es realmente el evocador del casbano o más bien los oligogalacturónidos liberados al llevarse a cabo la reacción enzimática, como ya se ha señalado en otros estudios.

Existe también evidencia de que los fragmentos pécticos resultantes de la acción de pectinasas inducen la producción de etileno en naranjas Valencia (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Baldwin y Biggs (1988) inyectaron una mezcla de enzimas fúngicas (*Apergillus japonicus*) en la cáscara de naranja. La mezcla indujo también la producción de ACC (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico) precursor inmediato del etileno. También inyectaron fragmentos pécticos obtenidos por hidrólisis ácida parcial y se obtuvo un incremento en la producción de etileno.

II.3.3. Peróxido de hidrógeno

Células de soya propagadas en medio de cultivo en suspensión producen H_2O_2 tan sólo 5 minutos después de ser expuestas a mezclas de oligogalacturónidos (Apostol, *et al.*, 1989) y células del mesófilo en hojas de jitomate experimentan una depolarización del potencial de membrana también tan sólo 5 minutos después de ser expuestas a concentraciones relativamente altas (1mg/ml) de oligogalacturónidos (Thain, *et al.*, 1990). Concentraciones más bajas (10 μ g/ml) de oligogalacturónidos con un grado de polimerización de 12 a 15 inducen, en 5 minutos, una estimulación de flujo de K^+ , flujo de Ca^{2+} , acidificación del citoplasma, y depolarización de la membrana plasmática en células de tabaco cultivadas en suspensión (Mathieu, *et al.*, 1991). También se ha encontrado que mezclas heterogéneas en tamaño de oligomanurónidos son aproximadamente 400 veces menos efectivas induciendo el flujo de K^+ . Estas observaciones proveen de evidencia para poder aseverar que oligogalacturónidos de tamaño específico y en concentraciones bajas, pueden inducir específicamente respuestas rápidas en la superficie de la célula vegetal (Hahn, *et al.*, 1993).

Fragmentos oligo-1,4- α -D-galacturónidos y oligo- β -glucanos evocan la producción de peróxido de hidrógeno en hipocótilos de pepino. La máxima concentración obtenida de estos fragmentos fue de 30 μ M, inhibiendo totalmente en una concentración de 26 μ M la germinación de los conidios de *Cucumis cucumerinum in vitro*. Ésto indica que los oligogalacturónidos producidos durante la infección producen peróxido de hidrógeno suficiente para convertirse en tóxico para el hongo invasor (Svalheim y Robertsen, 1993). Debido a la citotoxicidad de los compuestos de oxígeno y la rapidez con que son expresados seguido de la evocación, la combustión oxidativa se postula como la primera línea de defensa en contra de la invasión patógena (Legendre, *et al.*, 1993).

II.3.4. Lignina

Otra respuesta de defensa inducida por oligosacáridos es la producción de polifenoles con características similares a las de la lignina, v. g. que son teñidos por floroglucinol/HCl en hipocótilos de pepino variedad Wisconsin SMR 58 al ser inoculado el hongo *Cladosporium cucumerinum*. Los oligosacáridos resultaron estar compuestos de aproximadamente 11 unidades galacturonosil (Robertsen, 1986). Un año más tarde se encuentra que una endopoligalacturonasa de *C. cucumerinum* libera evocadores que permiten la lignificación de hipocótilos de pepino (Robertsen, 1987).

En este panorama sólo faltaría la presencia de PGIP en hipocótilos de la misma cucurbitácea, para explicar cómo es que sólo fragmentos de cierta longitud evocan la producción de lignina. Por lo menos, hasta ahora, se ha encontrado un inhibidor proteínico de PG en cultivos celulares de pepino (Abu-Goukh, *et al.*, 1983b). La lignificación parece ser un componente más de los mecanismos de resistencia en plantas de pepino en contra de patógenos como *Cladosporium cucumerinum* (Hijwegen, 1963) y de la misma forma, la lignificación es parte de los mecanismos de defensa en muchas otras plantas (Vance, *et al.*, 1980).

Oligogalacturónidos liberados por una poligalacturonasa de *Aspergillus niger* que tienen como sustrato al polipeptato de sodio evocan fenilalanina amonía liasa en cultivos en suspensión de *Daucus carota*. La actividad de esta enzima es importante en la formación de ácido cinámico, compuesto que es esencial para la biosíntesis de lignina (De Lorenzo, *et al.*, 1987).

II.3.5. Mecanismo de transducción de la señal emitida por los evocadores

Como se ha mencionado anteriormente, se concibe la idea de que los evocadores oligogalacturónidos son liberados durante la interacción planta hospedera-patógeno debido a la acción de pectinasas producidas por los microorganismos, en particular debido a la endopoligalacturonasa y la endopectato liasa. Sin embargo, *in vitro* la acción de estas enzimas resulta en la digestión inmediata del ácido poligalacturónico, de manera que los oligómeros son inactivos. Las proteínas inhibidoras de poligalacturonasas (PGIP), las cuales poseen una amplia especificidad en contra de las endopoligalacturonasas fúngicas (Albersheim y Anderson, 1971; Cervone, et al., 1990), reducen la actividad de dichas enzimas *in vitro* en un 99.7% aproximadamente (Cervone, et al., 1987a). Esta reducción en la actividad endopoligalacturonasa permite la acumulación de oligogalacturónidos activos biológicamente con DPs mayores a 10 y cuya existencia se alarga de minutos a horas (Cervone, et al., 1989). La actividad de la endopectato liasa no se afecta por las PGIPs (Cervone, et al., 1990). Sin embargo se ha presentado evidencia de que en el pH de la pared celular vegetal (pH 5-6), la actividad de esta enzima es reducida a tal nivel que la formación de evocadores con un DP mayor a 10 es favorecida nuevamente (De Lorenzo, et al., 1991). Estos resultados sugieren que las plantas poseen mecanismos que pueden regular la actividad de las enzimas degradadoras de pectina en tal modo que se favorece la producción de oligogalacturónidos biológicamente activos de mayor longitud (Hahn, et al., 1993).

La naturaleza de las respuestas de defensa vegetales inducidas por oligogalacturónidos dependen de la especie de planta que se está estudiando, ya que existen oligogalacturónidos que inducen la acumulación de fitoalexinas en soya (Davis, et al., 1986b) y perejil (Davis y Hahlbrock, 1987) mientras que otros inducen glucosilhidrolasas (β -

glucanasa, quitinasa, lisoenzimas) en perejil (Davis y Halbrock, 1987), tabaco (Broekaert y Peumans, 1988) o la deposición de lignina en pepino (Robertsen, 1987) y la acumulación de inhibidores de proteinasa en jitomate (Bishop, *et al.*, 1984). Los evocadores oligogalacturónidos y oligo- β -glucósidos actúan sinérgicamente ya que por ejemplo, la concentración requerida para evocar la producción de fitoalexinas cuando los dos evocadores están presentes es menor que la concentración requerida de cada evocador por separado (Davis, *et al.*, 1986a).

El tamaño de los oligogalacturónidos que evocan una respuesta de defensa es muy pequeño, ya que sus grados de polimerización son entre 10 y 15 residuos. Sin embargo, se ha encontrado que en el jitomate la inducción del inhibidor de proteasa se debe a evocadores de entre 2 y 20. Todavía se desconoce la razón de esta dependencia en el tamaño del evocador para desencadenar la respuesta defensiva (Hahn, *et al.*, 1993). Los oligogalacturónidos en presencia de Ca^{2+} , forman complejos intermoleculares llamados "egg boxes" (hueveras), las cuales requieren de fragmentos de oligopectato con un grado de polimerización mayor a 10. En base a la correlación entre el grado de polimerización requerida para estas conformaciones intermoleculares y la actividad evocadora, se propone que los complejos de oligogalacturónidos- Ca^{2+} son los verdaderos evocadores de las señales y no sólo los fragmentos *per se* (Liners, *et al.*, 1989; Messiaen y Cutsem, 1994).

En otros trabajos donde se identifican los evocadores de respuestas defensivas de plantas, se encuentra en muchos casos, que los evocadores de fitoalexinas son oligogalacturónidos de 12 residuos galacturonosil y que al exponer dichos fragmentos a la acción enzimática de enzimas como la endopoligalacturonasa o la pectato liasa, su actividad evocadora de fitoalexinas es destruída (Nothnagel, *et al.*, 1983).

El mecanismo por medio del cual los evocadores oligogalacturónidos inducen varias respuestas defensivas en las células vegetales de la planta infectada no se ha dilucidado completamente. Estudios recientes han demostrado que los oligogalacturónidos inducen diversas respuestas en la superficie de la pared celular y que quizá éste forme parte de la ruta de transducción de la señal. Oligogalacturónidos de tamaño específico (DPs 14 y 15) se han detectado como responsables del aumento *in vitro* de la fosforilación de una proteína de 34kD asociada con membranas plasmáticas aisladas de células de hojas provenientes de jitomate y papa (Farmer, *et al.*, 1991; Farmer, *et al.*, 1989). La fosforilación de la proteína de 34 kD no aparenta estar directamente relacionada con la inducción de la acumulación del inhibidor de la proteasa en jitomate, ya que oligogalacturónidos con DPs menores a 14 inducen la producción de dichos inhibidores pero no aumentan la fosforilación de la proteína de 34 kD *in vitro* (Farmer, *et al.*, 1991).

Los efectos casi instantáneos producidos por los oligogalacturónidos en la superficie de la célula vegetal no han sido correlacionados aún con alguna respuesta de defensa vegetal conocida. Se necesita mayor conocimiento de las respuestas producidas en membrana plasmática para poder entender los primeros pasos de la ruta de transducción de señales inducida por fragmentos oligogalacturónidos (Hahn, *et al.*, 1993).

Varias respuestas que ocurren en la superficie de la célula vegetal podrían ser parte del mecanismo de transducción originado por la señal proveniente de los oligogalacturónidos. Se ha demostrado que estos evocadores inducen en sólo 5 minutos, la estimulación de un flujo de Ca^{2+} citoplasmático, un eflujo de K^+ , una acidificación del citoplasma y una depolarización de membrana plasmática en células cultivadas de tabaco; más tarde los fragmentos pudieran

ser internalizados por medio de una endocitosis mediada por un receptor (Cervone, *et al.*, 1997). El papel del Ca^{2+} como mensajero secundario en la transducción de señales en la ruta de los oligogalacturónidos ha sido propuesto por Farmer, *et al.*, (1991).

Dumville y Fry (2000) publican que cultivos de tejidos de rosa (*Rosa sp.*) no producen oligosacáridos pécticos. Su ausencia no se debe a su rápida degradación, ya que cuando fragmentos oligogalacturónidos son añadidos al cultivo, éstos se hidrolizan muy lentamente. La hidrólisis se lleva a cabo por una' exoPG, produciendo ácido galacturónico libre. Si los oligogalacturónidos no se añaden, no hay acumulación de ácido galacturónico, por lo tanto, la exoPG no opera en células sanas de *Rosa sp*, presumiblemente se encuentra "en reserva", para dispararse cuando los oligogalacturónidos son producidos por patógenos. Estos autores proponen el estudio de la actividad enzimática de una manera más apropiada a nivel de metabolismo de carbohidratos *in vivo* que a nivel de enzimas extraídas y analizadas *in vitro*.

Las proteínas G son componentes esenciales en varias rutas de transducción de señales en células animales. Estas proteínas poseen estructuras altamente conservadas. La activación de un receptor transmembranal estimula el cambio de GTP a GDP (guanosina triotrfosfato en guanil difosfato) en la subunidad α de la proteína G asociada con el polo citoplasmático del receptor. La disociación de la subunidad α del complejo $\beta\gamma$ seguida por la interacción de la subunidad α con su efector permite la activación de dicho efector que puede ser una fosfolipasa, ciclasa, canal iónico, fosfodiesterasa, etc. En plantas, la función de proteínas que se unen a GTP no se ha comprendido totalmente, pero la bibliografía que documenta la existencia de este tipo de proteínas es muy vasta. Existe la evidencia de que proteínas G participan en la rápida combustión oxidativa en células cultivadas de soya (Legendre, *et al.*, 1992).

Los oligosacáridos que poseen actividades reguladoras de expresión de genes esenciales para el desarrollo, crecimiento y supervivencia en plantas se conocen como oligosacarinas. La importancia de las oligosacarinas como moléculas reguladoras en plantas no puede discutirse con base sólo en los estudios hechos *in vitro*, sin embargo, el papel de estas moléculas queda por ser ratificado. Se necesitan estudios con plantas intactas, y es aquí, de nuevo, donde el uso de plantas transformadas con genes que codifiquen para enzimas, receptores u otras proteínas que alteren la actividad *in situ* de las oligosacarinas es de gran ayuda (Darvill, *et al.*, 1992).

Una proteína constitutiva de la membrana plasmática en células de *Solanum tuberosum* L. llamada pp34, es el único ejemplo de proteína en membrana plasmática fosforilada específicamente en respuesta a señales de oligogalacturónidos determinados en plantas. Su purificación permitirá investigaciones que puedan elucidar el papel de la fosforilación proteínica en el sistema de inducción de respuestas defensivas por oligourónidos en plantas de jitomate y papa (Jacinto, *et al.*, 1993).

Oligogalacturónidos de 13 a 26 residuos estimulan la tiofosforilación de la pp34 *in vitro*. Este patrón de estimulación difiere del de la inducción de respuestas defensivas *in vivo*, donde fragmentos más pequeños son evocadores activos (Reymond, *et al.*, 1995).

Se ha encontrado que fragmentos oligogalacturónidos depolarizan las células de hojas del jitomate inhibiendo la ATPasa H⁺, aunque el mecanismo de inhibición no se ha elucidado todavía (Thain, *et al.*, 1995).

Otros autores sugieren que la transducción de señales producidas por oligogalacturónidos es llevada a cabo gracias a la presencia de iones calcio libres en el citosol, ya que se produce un incremento en Ca²⁺ en protoplastos de zanahoria 20 minutos después de su exposición a ácido poligalacturónico y fragmentos oligogalacturónidos

(Messiaen, *et al.*, 1993). Sólo oligogalacturónidos con un grado de polimerización mayor a 9 indujeron una acumulación masiva de genes relacionados con la respuesta defensiva vegetal en células de zanahoria (Messiaen y Van Cutsem, 1993).

Los receptores en la membrana plasmática tienen un papel muy importante en la transmisión de señales. Muchos de estos receptores son miembros de la familia tirosina-cinasa, los cuales están compuestos por un dominio extracelular que se une al ligando y un dominio citoplasmático que posee la actividad tirosina-cinasa. Estos receptores son activados cuando el ligando se une al dominio extracelular causando un cambio conformacional en la molécula lo cual incrementa la actividad catalítica del dominio citoplasmático. La información acerca de este tipo de receptores en plantas vasculares es muy escasa (Walker, 1993).

La primera evidencia de una proteína cinasa transmembranal es la de una proteína codificada por el gen *ZmPK1* existente en *Zea mays* que posee características muy similares a las de una proteína cinasa. Más tarde, se encontraron en *Brassica sp.*, genes que codifican para glicoproteínas relacionadas con la autoincompatibilidad y que tienen también semejanza con proteínas cinasas. Para *Arabidopsis thaliana* se describen tres diferentes genes relacionados con *ZmPK1*. Estos genes codifican para proteínas cinasas putativas. Uno de los tres genes posee un dominio extracitoplasmático compuesto de 21 repeticiones en tándem de leucina que aparentan ser similares a las encontradas en proteínas ricas en repeticiones de leucina ("LRR-leucine repeat rich proteins") (Walker, 1993).

En plantas, la resistencia a un patógeno está frecuentemente correlacionada con la interacción genéticamente definida entre un gen de resistencia vegetal y su correspondiente gen de avirulencia del patógeno. Los productos de un gen de avirulencia generan ligandos (señales) y si es que existe un gen de resistencia en la planta el producto será un receptor de dicho ligando. El gen *RPS2* de *A. thaliana* confiere resistencia al patógeno bacterial *P.*

syringae que posee el gen de avirulencia *avrRpt2*. *RPS2* codifica para una proteína de 105 kDa que contiene un "cierre" de leucina, un sitio para la unión de nucleótidos y una zona de 14 repeticiones imperfectas de leucina (Mindrinos, *et al.*, 1994).

Se ha encontrado que el gen *FIL2* encontrado en *Antirrhinum sp* codifica para una proteína extracelular con repeticiones de leucina en su configuración. El gen se expresa en flores y especialmente en filamentos, anteras y estigma. Estos resultados sugieren que dicho gen podría estar vinculado con el sistema de autoincompatibilidad o en morfogénesis como algunas proteínas ricas en leucina encontradas en animales (Steinmayr, *et al.*, 1994).

CAPÍTULO III. Proteínas inhibidoras de poligalacturonasa (PGIPs - polygalacturonase inhibitor proteins)

III.1. Descubrimiento

Uno de los primeros artículos en donde se publica el descubrimiento de inhibidores de pectinasas es el de Uritani y Stahmann (1961). En este trabajo se estudian las enzimas pectolíticas producidas por *Ceratocystis fimbriata*, hongo que provoca la pudrición negra del camote. Los autores encontraron que el extracto de camote inhibe las actividades enzimáticas de las depolimerasas producidas por *C. fimbriata* y que dicha inhibición aumenta con el tiempo de incubación. Sin embargo, al calentar el extracto de camote en agua hirviendo por 25 minutos se perdió toda actividad inhibitoria. El inhibidor fue precipitado con sulfato de amonio. Debido a lo anterior los autores concluyen que el inhibidor podría ser una proteína termolábil. En el mismo artículo se mencionan otras características de este inhibidor proveniente del camote, como es su especificidad, ya que no inhibió actividad celulasa e inhibió en un grado mínimo tanto las depolimerasas de *Fusarium oxysporum* como la actividad de una depolimerasa comercial llamada pectinol (Hoffman y Turner, 1982).

Más tarde, Albersheim y Anderson (1971) extrajeron proteínas de las paredes celulares de hipocótilos de frijol capaces de inhibir la actividad de poligalacturonasas secretadas por los patógenos fúngicos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotium rolfsii*. Así, hasta 1982, se define a una unidad de actividad PGIP como la cantidad de proteína PGIP requerida para reducir la actividad PG en un 50% (Hoffman y Turner, 1982).

Se han encontrado hemaglutininas en las semillas de plantas vasculares y han sido estudiadas, especialmente, en semillas de leguminosas. También se han reportado proteínas que aglutinan células animales transformadas (Albersheim y Anderson, 1971).

Albersheim y Anderson (1971) enfatizan que las proteínas inhibidoras encontradas en extractos vegetales son parecidas a dichas aglutininas, debido a su estabilidad térmica, su peso molecular, y al hecho de que se unen al gel cromatográfico Sephadex G-25-300. Además existe la hipótesis de que las aglutininas hayan evolucionado en respuesta a la presencia de patógenos vegetales, actuando de manera semejante a un anticuerpo de origen animal. Ambos autores también refutan uno de los resultados obtenidos por Uritani y Stahmann (1961) al encontrar que tanto el inhibidor proteínico como un reactivo de cobre alcalino detienen la reacción enzimática con la misma rapidez al ser añadidos, por lo tanto no se necesita incubación previa de la enzima y el inhibidor. Estudios recientes han prestado atención a la posible importancia de este grupo de inhibidores en la descomposición enzimática de las paredes celulares (Albersheim y Anderson, 1971; Fisher, *et al.*, 1973).

Los inhibidores proteínicos obtenidos de paredes celulares de frijol y jitomate no inhiben celulasa, xilanasas, galactosidasas, α -arabinofuranosidasas o liasas pectínicas. Se ha demostrado *in vitro* que el inhibidor de la poligalacturonasa extraído de paredes celulares de jitomate protege dichas paredes de la degradación producida por el complejo enzimático producido en cultivo por *F. oxysporum lycopersici* (Jones, *et al.*, 1972).

Intentos por demostrar diferencias significativas entre inhibidores proteínicos producidos por variedades de frijol susceptibles y no susceptibles a las cepas α , β y γ de *C. lindemuthianum* han fracasado, ya que las poligalacturonasas producidas por cada cepa y los inhibidores proteínicos de las variedades de frijol parecen no ser altamente específicos (Bateman y Bashman, 1976). Se propone que la aparente especificidad mostrada en investigaciones anteriores dependa más bien en la cantidad de inhibidor producida por la célula vegetal y la cantidad de enzima producida por parte del patógeno. Otra hipótesis es que el proceso infeccioso diferencial dependa de la presencia o ausencia de sustancias

específicas en la planta las cuales regulan la secreción de enzimas producidas por el patógeno (Anderson y Albersheim, 1972).

El debate alrededor de los inhibidores proteínicos de poligalacturonasas consiste en que algunos autores defienden la idea de que los inhibidores son específicos y por lo tanto inhiben sólo ciertas enzimas producidas por ciertos patógenos e inclusive ciertas líneas de una especie de patógeno, mientras que otros creen que las proteínas inhibidoras no son específicas y que la especificidad observada se debe a otros factores. Fisher y otros colaboradores de Albersheim, encuentran, en 1973, que la endopoligalacturonasa extraída de *Colletotrichum lindemuthianum* es inhibida por el inhibidor purificado de paredes celulares de *Phaseolus vulgaris* casi tan efectivamente como la endoPG de *Aspergillus niger* (Fisher, et al., 1973).

Hasta 1981 no había evidencia que aclarara si estos inhibidores proteínicos existían en tejidos sanos de forma latente, si eran liberados o activados por la presencia del patógeno o si eran sintetizados *de novo* consecuentemente a la infección (Fielding, 1981). Se van caracterizando poco a poco nuevos inhibidores con características congruentes con los resultados de Albersheim y Anderson (1971), aunque los pesos moleculares difieren y se encuentra que dichos inhibidores actúan sólo en contra de poligalacturonasas secretadas por ciertos organismos patógenos, como en el caso de las proteínas inhibidoras encontradas en durazno y ciruela cuyo peso molecular promedio es de 15 000 siendo el publicado por Albersheim y Anderson (1971) para el inhibidor en *P. vulgaris* de 50 000 y que sólo inhiben poligalacturonasa producida por *Monilinia* spp y la secretada por *Rhizopus sexualis*, *R. stolonifer*, *Mucor mucedo*, *Phytophthora infestans* y *Penicillium* sp. (Fielding, 1981).

III.2. Características bioquímicas y clasificación

Las PGIPs están localizadas en la pared celular vegetal. Son glicoproteínas termoestables abundantes en leucina y con un 20% de carbohidratos, su peso molecular varía entre 37-54kD. La síntesis de PGIP es codificada por un gen, cuya expresión es estimulada por la penetración del patógeno en el tejido vegetal. La resistencia de tejidos vegetales a la infección está correlacionada con la expresión de PGIP y su unión con la PG. Por lo tanto, se supone que este inhibidor es de gran utilidad para la ingeniería genética pudiéndose obtener plantas transgénicas resistentes a la invasión fúngica o que mantengan su valor comercial durante su almacenaje y traslado (Glinka y Protsenko, 1998).

Una característica de las PGIPs en su estructura modular compuesta por repeticiones abundantes de leucina (LRR-siglas en inglés "leucine rich repeats"). Por ejemplo, en *P. vulgaris*, el dominio desde el aminoácido 69 al 326 está dividido en conjuntos de 10.5 unidades repetitivas en tándem, cada una derivada de modificaciones de un péptido de 24 aminoácidos (De Lorenzo y Cervone, 1996).

Las PGIPs también presentan similitudes con una clase de proteínas animales extracitoplasmáticas abundantes en leucina llamadas SLRPs (siglas en inglés "small leucine-rich proteoglicans"), que incluyen 5 miembros que están estructuralmente relacionados y son: decorina, biglucano, fibromodulina, lumicano y epifcano. Las PGIPs y las SLRPs son solubles en matriz extracelular y exhiben tamaños moleculares parecidos, número similar de LRR en los dominios así como conjuntos abundantes en cisteína. Se sabe que algunas SRLPs interaccionan con colágeno, fibronectina y el factor β de crecimiento. Por lo tanto, el papel que probablemente tengan las PGIPs en morfogénesis y proliferación celular no debe ser causa de sorpresa (Iozzo y Murdoch, 1996; De Lorenzo y Cervone, 1996).

La estructura cristalográfica de una proteína LRR, el inhibidor porcino de ribonucleasa (PRI siglas en inglés "porcine ribonuclease inhibitor"), consiste en unidades β - α (Fig. 5). La proteína adopta una figura tridimensional semejante a la herradura de un caballo que puede ser responsable de la capacidad de esta proteína para unirse a otras moléculas. Sin embargo, el inhibidor de ribonucleasa posee unidades repetitivas de 28 a 29 aminoácidos, mientras que la PGIP y otras proteínas LRR poseen 23 o 24 aminoácidos por unidad repetitiva. Por ello, se formula la hipótesis de que otras proteínas LRR incluyendo PGIPs presentan la estructura en β hélice de la pectato liasa, resultando así una molécula helicoidal lineal o quizá ligeramente curvada y no una en forma de herradura como la del inhibidor de ribonucleasa (Kobe y Deisenhofer, 1994). En 1999, Leckie y colaboradores corroboran la sugerencia de Kobe y Deisenhofer (1994), publicando en su artículo la estructura cristalográfica de la PGIP-1 de *P. vulgaris* (Fig. 6).

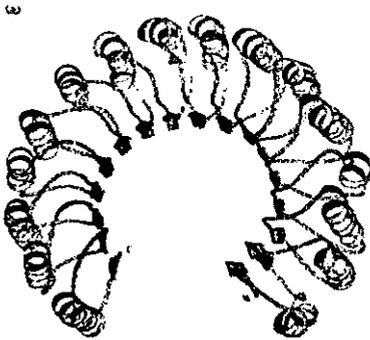


Fig. 5. Representación esquemática de la estructura del inhibidor de ribonucleasa de origen animal. La estructura primaria posee 15 repeticiones abundantes en leucina (LRRs) de 28 y 29 residuos de largo alternándose. Tridimensionalmente las LRRs individuales representan unidades β - α parecidas a caireles. La hebras β (17) y las hélices α (16) se encuentran paralelas en unidades individuales β - α y las unidades están a su vez alineadas casi paralelamente a un eje común. La estructura resultante es parecida a la herradura de un caballo. La banda β , donde se localizan los residuos altamente conservados, se encuentra en la parte interna de la herradura y la superficie cóncava externa está expuesta al solvente (Kobe y Deisenhofer, 1993).

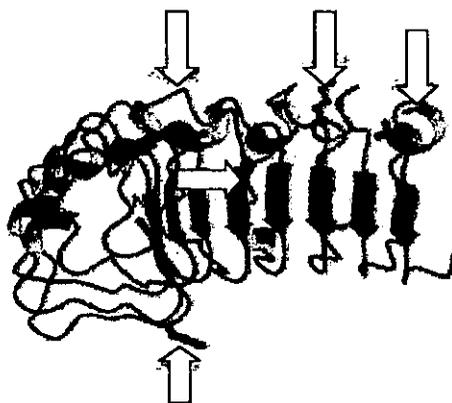


Fig. 6. Representación de la estructura de la PGIP-1. Las bandas β están coloreadas de verde y las hélices α en rojo-amarillo. Las posiciones de los cinco aminoácidos diferentes entre PGIP-1 y PGIP-2 que caen en la región abundante en leucina, están señalados en la figura por flechas (Leckie, *et al.*, 1999).

Se han encontrado PGIPs en varias dicotiledóneas incluyendo: frijol, pepino, chícharo, pimiento, jitomate, manzana, pera, durazno, naranja, alfalfa, soya, frambuesa, paprika, col, ciruela, papa, camote, aguacate y sicómoro. Las únicas monocotiledóneas en las que se ha detectado actividad PGIP son *Allium cepa*, *A. porrum* (De Lorenzo y Cervone, 1996) y el trigo (*Triticum aestivum*) (Zhou, *et al.*, 1998).

La purificación y caracterización de los inhibidores de poligalacturonasas es indispensable para poder estudiarlos *in vivo*. La purificación y caracterización parcial de los inhibidores de poligalacturonasas presentes en la pera, inhibidor PG I y II, se llevó a cabo encontrando que cada inhibidor tiene un peso molecular de 91 000 daltones y está compuesto por dos subunidades idénticas. Su actividad inhibitoria se pierde si los inhibidores son expuestos a una temperatura arriba de 60° C. Varias características de estos inhibidores, como el peso molecular y la cierta labilidad térmica que poseen, sugirieron que se trata de proteínas (Abu-Goukh, *et al.*, 1983b).

Al estudiar las características de la reacción enzima-sustrato-inhibidor se encontró que la velocidad de ésta depende de la concentración del sustrato. Concentraciones de ácido poligalacturónico (APG) de más de 600 $\mu\text{g ml}^{-1}$ resultan inhibitorias por sustrato. Sin embargo, concentraciones altas de sustrato tienen un efecto mínimo en el grado de inhibición

debido a la presencia del inhibidor de la pera. Si un inhibidor competitivo es añadido al sistema enzimático, la inhibición continúa a concentraciones de sustrato mucho mayores. Una inhibición de 48% a concentración de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ disminuye 25 y 17% en concentraciones de APG de 300 y $600 \mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente. Ésto sugiere que el inhibidor PG de la pera es competitivo (Abu-Goukh, *et al.*, 1983b).

Al parecer las PGIPs son inhibidores reversibles ya que Cervone, *et al.*, (1987b) publican que al formarse el complejo PG-PGIP se perdió la actividad enzimática poligalacturonasa por completo pero se recuperó inmediatamente al disociar el complejo PG-PGIP con una solución amortiguadora 0.5M de acetato de sodio con valores de pH menores a 4.5 o mayores a 6.0, La PG se obtuvo de preparaciones comerciales de *Aspergillus niger* y la PGIP fue purificada de un extracto de paredes celulares de *Phaseolus vulgaris* L.

Un inhibidor de poligalacturonasa con una masa molecular aparente de 43 kDa fue purificado de la fruta de la pera. La deglicosilación de esta proteína redujo el peso molecular a 34 KDa. Los análisis de cromatografía de gases sugieren que la glucosilación del extremo N contiene la mayoría de los residuos de azúcar. El análisis de la secuencia de aminoácidos aportó la información necesaria para amplificar el ADN codificador correspondiente por medio de reacciones de polimerasa en cadena (PCR). El ADNc codifica un polipéptido de 36.5 kDa cuyos aminoácidos fueron determinados por medio de una secuenciación proteínica prediciéndose así una secuencia de 24 aa y 4 sitios de glicosilación en el extremo N. La expresión del inhibidor es regulado de una manera específica según el tejido del que se trate. Se encontró que el nivel de ARN mensajero es mucho mayor en el fruto que en las flores o las hojas (Stotz, *et al.*, 1993).

Abu-Goukh, *et al.*, (1983a) encuentran que la concentración del inhibidor de poligalacturonasa fúngica propio de frutos de la pera, variedad Bartlett, decrece durante la maduración del fruto y al mismo tiempo se incrementa la susceptibilidad de los frutos a la invasión de patógenos.

Otro artículo fundamental en la historia de las glicoproteínas inhibitoras de poligalacturonasas es el publicado en 1994 por Stotz y colaboradores. En este artículo se da a conocer la estructura de una PGIP del jitomate y su patrón de expresión. El inhibidor posee una masa molecular de 35 a 41 kDa, su punto isoeléctrico es de 9 y posee una masa molecular al ser deglicosilada de 34 kDa, ésto sugiere que comparte similitudes con la PGIP de la pera, sin embargo PGIP del jitomate es casi 20 veces menos efectiva que la PGIP de la pera al inhibir la actividad poligalacturonasa de *B. cinerea*. El análisis de la secuencia de la PGIP de la pera revela que esta proteína pertenece a una clase de moléculas que contienen repeticiones en tándem de leucina. Debido a que la presencia de estos dominios se encuentra asociada con interacciones proteína-proteína, es posible que contribuyan a la interacción de PGIPs y poligalacturonasas de origen fúngico (Stotz, *et al.*, 1994).

La estructura cristalográfica del inhibidor proteínico de la ribonucleasa revela que las repeticiones abundantes en leucina corresponden a unidades estructurales β - α . Estas unidades están distribuidas de manera que forman una hoja β paralela con uno de los lados expuesto al solvente de manera que la proteína adquiere una estructura inusual, no globular. Estas dos características de las proteínas que contienen repeticiones de leucina pueden explicar su habilidad de asociarse con otras proteínas (Kobe y Deisenhofer, 1994).

El gen *pgip* de *P. vulgaris* que codifica para la PGIP en *P. vulgaris* consiste de un fragmento de 758 pares de bases, es abundante en leucina junto con otros residuos como son

Asn, Ser, Gly y Thr. El gen no posee intrones y la síntesis de PGIP en frijol es inducida a nivel transcripcional por evocadores e incisiones en hipocótilos (Cervone, *et al.*, 1993).

La secuencia del gen que codifica para PGIP en el frijol tiene 50% de similitud con ambos genes que codifican para la PGIP del jitomate y la pera. Entre las secuencias de la pera y el jitomate existe 68% de similitud (Powell, *et al.*, 1994). Entre la PGIP de la soya y el frijol existe 77.6 % de similitud y entre la soya PGIP y la pera PGIP 60.3%. Otros genes que codifican para PGIP se han clonado para el kiwi y *Citrus sinensis*, aunándose a los de la pera, frijol, soya y jitomate, que se han referido con mayor detalle (De Lorenzo y Cervone, 1996). Para comprender el papel de las PGIP se necesita la caracterización de todos los genes *pgip* y su regulación. También se tiene que tomar en cuenta que las proteínas que codifican estos genes no sólo podrían reconocer endoPGs fúngicas sino otras moléculas.

Una gran variedad de proteínas encontradas desde levaduras y hasta humanos contienen repeticiones de leucina en tándem, como la PGIP. Algunos ejemplos son la glicoproteína humana abundante en leucina (LRG), el dominio no catalítico de adenilato ciclasa de levadura, la glicoproteína caoptin del fotorreceptor de membrana en *Drosophila sp.*, etc. Considerando el rango de organismos en el que se encuentran este tipo de proteínas y las diversas funciones que desempeñan se puede concluir que existe una fuerte presión de selección a favor de la conservación de esta estructura. Una característica común de estas proteínas es que están asociadas a membranas y/o se unen a otras proteínas, por lo tanto son receptores putativos (De Lorenzo, *et al.*, 1994).

La estructura de la PGIP y la proteína RLK5 de *A. thaliana* son similares aunque sólo en lo que incumbe al dominio extracelular que se une al receptor. A su vez, la estructura del dominio catalítico de la RLK5 comparte secuencias similares con genes como *ZmPK1*, RLK1 y RLK4 que parecen estar involucrados en el sistema de autoincompatibilidad y reconocimiento

en la interacción pólen-estigma en *Brassica sp* difiriendo su dominio extracelular de aquel de PGIP o RLK5. Por lo tanto la estructura de la PGIP parecida a la de receptores membranales debido a la presencia de repeticiones de leucina otorga bases moleculares para proponer a estos inhibidores como parte del mecanismo de reconocimiento entre plantas y sus patógenos. Sin embargo el papel de las PGIPs como posibles proteínas involucradas en la transducción de señales está todavía inconcluso. Podría ser que el gen PGIP haya divergido de aquellos genes cuya proteína que codifican tiene función receptor extracelular-receptor transmembranal cinasa perdiendo la función cinasa y sólo funcionando como receptor de ligandos. Este debate podría esclarecerse si se caracterizaran un mayor número de genes que codifican para PGIPs (De Lorenzo, *et al.*, 1994).

Para el año de 1998, en *Phaseolus vulgaris*, la PGIP es codificada por una familia de genes. Se han aislado dos clones de ADNc que corresponden a dos genes *pgip* (*pgip-1* y *pgip-2*). Estos genes se han expresado individualmente en *Nicotiana benthamiana*. Las proteínas obtenidas muestran diferentes especificidades al inhibir distintas endoPGs provenientes de patógenos distintos. En lo referente a la acumulación de transcritos de los dos genes, *pgip-1* transcritos se acumulan al dañar el tejido vegetal pero no al añadirse evocadores, ácido salicílico o infección patógena, mientras que los transcritos *pgip-2* se acumulan en respuesta a todos los estímulos mencionados. Estas observaciones indican que los miembros de la familia de genes *pgip* poseen una especificidad diferente y que por lo tanto también son regulados diferencialmente en *P. vulgaris* (Cervone, *et al.*, 1998).

Se ha realizado la purificación parcial de inhibidores proteínicos provenientes de folíolos de *Pisum sativum* L. que inhiben la endopoligalacturonasa de *Ascochyta pisi*. El peso molecular del inhibidor fue de 42 000. El inhibidor fue encontrado unido a la pared celular y en forma soluble. Los autores sugieren que quizá se trata de dos distintas formas del inhibidor y

que quizá se encuentren en otras plantas pero que su distinción haya sido pasada por alto (Hoffman y Turner, 1982).

Lafitte, *et al.*, (1984) estudian los inhibidores de la endopoligalacturonasa de *Colletotrichum lindemuthianum* extraídos de paredes celulares de hipocótilos de *P. vulgaris* y encuentran que se tratan de glicoproteínas con un peso molecular aproximado de 46 000 daltones. Notan también que la degradación llevada a cabo por una endoPG purificada de *C. lindemuthianum* fue reducida cuando las paredes celulares contenían los inhibidores, en comparación con las preparaciones de paredes celulares que carecían de proteínas o inhibidores unidos iónicamente. Por lo anterior se sospecha que los inhibidores de endoPG podrían reducir la actividad del patógeno que produce PGs *in vivo*. La posibilidad de que los inhibidores tuvieran una actividad proteolítica fue rechazada al añadir inhibidores de proteasa como el compuesto EDTA y obtener que no tuvieron ningún efecto en la actividad del inhibidor (Lafitte, *et al.*, 1984).

Otro resultado que contradice lo encontrado para los inhibidores de PG en la pera, es que el inhibidor de PG en *P. vulgaris* no es competitivo, ya que se encontró que al incrementar la concentración del inhibidor se redujo la velocidad de reacción y no cambió la K_m . Este estudio también ratifica que los niveles del inhibidor no cambiaron después de la inoculación del patógeno y por lo tanto el papel de estos inhibidores se clasificaría dentro de los factores en la resistencia pasiva vegetal y no como parte de la resistencia activa. Sin embargo, la existencia de estas glicoproteínas inhibidoras retarda en cierto grado la invasión del patógeno lo que respalda las respuestas activas que el hospedero pueda desarrollar (Lafitte, *et al.*, 1984).

Una proteína que inhibe PG secretada por *Diplodia natalensis* fue aislada de extractos de cáscara de naranja variedad Valencia infectada y sin infectar. El inhibidor tuvo un peso

molecular de 54 000 daltones y fue inactivado por calor y una proteasa y su modo de inhibición de la PG es competitivo (Barmore y Nguyen, 1985).

En esta revisión se ha optado en clasificar a las PGIPs en razón de su interacción con la enzima y el sustrato (cinética). No se pretende con ello, ignorar que esta clasificación es arbitraria y que existe un número grande de características en las cuales se podrían basar otras clasificaciones, como la del origen biológico, grado de glicosilación, peso molecular, etc. No obstante, se debe aclarar que se utiliza la siguiente clasificación debido a que las demás características de los inhibidores resultan controversiales en los artículos consultados. Hay que aclarar que la cinética de inhibición no es una característica que nos asegure una clasificación correcta, ya que puede depender de la PG en cuestión y no reflejaría entonces una propiedad de las PGIPs.

Los inhibidores competitivos serán aquellos que como la PGIP de la pera y la naranja, se unen en el sitio activo de la PG de *B. cinerea*, mientras que los PGIPs que se clasifiquen como inhibidores no competitivos, serán aquellos como la PGIP del jitomate, el frijol y la frambuesa que se unen a la PG de *A. niger* en otro sitio de la enzima de manera que el sitio activo es modificado y la enzima no puede unirse al sustrato.

III.3. Funciones

III.3.1. Polinización y morfogénesis

Se han hecho pruebas en distintos órganos de plántulas y diferentes estadios de desarrollo en plantas de *P. vulgaris*, encontrándose que los niveles más altos se encuentran en el ápice vegetativo y en la flor y que los niveles de PGIP en los tallos se incrementan durante el desarrollo de la planta. Como ya se ha mencionado, los granos de pólen de diferentes

plantas presenta actividad poligalacturonasa y se presume que dichas pectinasas son requeridas para la degradación durante el desarrollo del grano de pólen y el crecimiento del tubo polínico. La presencia de PGIP en las flores abre las puertas a nuevas hipótesis, podría haber una posibilidad de que la PGIP en el estigma y estilo interactúe con la PG del pólen como parte del proceso de reconocimiento determinando compatibilidad o incompatibilidad. Hay que mencionar aquí, de nuevo, que la PGIP de *P. vulgaris* inhibe una exoPG producida por el grano de pólen del maíz (Salvi, *et al.*, 1990). Haciendo más intrigante esta hipótesis, Marfa, *et al.*, (1991) encuentran que oligogalacturónidos con un grado de polimerización 12-14 provenientes de paredes celulares de sicomoro producidos por endopoligalacturonasa de *A. niger* estimulan la formación de flores en cultivos de tejidos de plantas de tabaco. También se ha reportado que los oligogalacturónidos inhiben la formación de raíces en callos celulares de plantas de tabaco. Estos datos sugieren que los oligogalacturónidos son capaces de evocar tanto respuestas defensivas como de afectar el desarrollo floral e inhibir la inducción de morfogénesis de raíces en tabaco (Bellincampi y Salvi, 1993).

CAPÍTULO IV. Defensa vegetal. Inhibición de poligalacturonasas producidas por patógenos e insectos

IV. Función en patogénesis

Uno de los artículos claves para esta revisión es el publicado por Cervone y sus colegas en el año de 1986 bajo el título en inglés: "Interaction of fungal polygalacturonase with plant proteins in relation to specificity and regulation of plant defense response" ("Interacción de la poligalacturonasa fúngica con proteínas de origen vegetal en relación a la especificidad y regulación de la respuesta de defensa vegetal") en donde se propone un sistema de defensa vegetal que da sentido y enlaza la función de los inhibidores de PGs y de los fragmentos oligalacturónidos evocadores. En la investigación se encuentra que los oligómeros de galacturonato liberados por el complejo PG-PGIP hicieron aparecer una respuesta hipersensible en *Vigna unguiculata*. Los datos obtenidos muestran un reconocimiento específico entre la PG fúngica –purificada de una preparación comercial de pectinasas producidas por *Aspergillus niger*- y la PGIP vegetal y que las características de los oligosacáridos evocadores son fuertemente influenciadas por el complejo PG-PGIP. Los autores sugieren que la función *in vivo* de las proteínas inhibidoras de poligalacturonasas (PGIPs) es contrarrestar la invasión fúngica al utilizar las mismas poligalacturonasas exógenas para la producción de evocadores de respuestas de defensa en la planta. Concluyen enfatizando los siguientes puntos: i) el destino de la interacción planta hospedera-patógeno podría depender del tipo de oligosacáridos que se formen durante la degradación de la pared celular vegetal, ii) la velocidad con que sean producidos dichos oligosacáridos podría

ser regulada por la actividad PG, iii) la actividad PG podría ser regulada por proteínas de reconocimiento localizadas en la pared celular (PGIPs) (Cervone, *et al.*, 1986).

Es importante aclarar en este apartado que la especificidad engloba no sólo los factores que determinan virulencia por parte del patógeno sino aquellos que confieren resistencia por parte de la planta hospedera. Existen dos tipos de especificidad: aquella donde el patógeno posee un rango vasto de huéspedes, lo que significa que el parásito está menos especializado y aquella donde el patógeno está restringido a un número de especies huésped, en este caso para cada variedad resistente surgirá una nueva raza mutante del patógeno ante la cual el huésped deje de ser incompatible. Dentro de los tipos de resistencia del huésped están: la pasiva, la activa y los mecanismos evasivos (Agrios, 1997).

La resistencia pasiva está caracterizada por ser constitutiva e incluye las barreras anatómicas o químicas que previenen el establecimiento del patógeno *a priori*. Algunas características anatómicas que son clasificadas como de resistencia pasiva son la cutícula, la cera y la corteza. Dentro los mecanismos defensivos pasivos de naturaleza química se puede mencionar la producción de metabolitos secundarios como alcaloides, fenoles fungitóxicos, glucósidos cianogénicos, resinas, taninos y glicoproteínas localizadas en la pared celular que inactivan enzimas pectolíticas (Agrios, 1997).

La resistencia activa es inducida, puede ser estructural o química y no se detecta en plantas sanas. Algunos mecanismos activos de resistencia son la producción de tálides o calosa, o la producción de fitoalexinas. También dentro de la resistencia activa del hospedero se encuentra la respuesta hipersensible que se caracteriza por la acumulación de fitoalexinas, la alteración de la pared celular y la activación de mecanismo de reparación en zonas alteradas. Los mecanismos evasivos son aquellos que permiten al hospedero escapar del contacto físico con el patógeno ya sea al crecer en un ambiente no favorable para el

microorganismo o completando el ciclo de vida durante períodos en los cuales el patógeno se encuentra inactivo (Agrios, 1997).

Los mecanismos activos de resistencia son inducidos como ya se ha señalado por lo tanto se requiere de un sistema que desencadene dicho mecanismo. La información generada alrededor de las fitoalexinas y sus evocadores aportan algunas claves para esclarecer el sistema. El papel de dichos evocadores en la especificidad dentro de la interacción hospedero-patógeno es discutido por Dickinson (1982), quien plantea el problema de dos maneras: la primera es que estos compuestos podrían ser esenciales en la resistencia del hospedero en general no siendo específicos. Es decir, la célula vegetal podría ser capaz de reconocer una gran variedad de microorganismos basándose en el contacto con polímeros comunes en las paredes celulares de casi todos los microorganismos. La hipótesis alterna es que los evocadores son específicos y por lo tanto diferencias mínimas en las moléculas de la pared celular de variedades de patógenos determinarían la inducción o no de una respuesta de defensa por parte del hospedero. Dickinson (1982) toma en cuenta a los evocadores de origen fúngico que se han reportado induciendo producción de fitoalexinas en algunas plantas como el frijol, sin embargo el autor ignora el trabajo de Hahn, et al. (1981) donde se encuentra un evocador proveniente de la pared de la célula vegetal. Que el evocador provenga de la pared celular vegetal cambia completamente las hipótesis enunciadas arriba. Al ser el evocador propio de la planta y liberado por la acción de una enzima degradadora de pared celular, pocas son las probabilidades de que confiera especificidad en la interacción y por lo tanto tendríamos que buscar un mecanismo alterno que confiera dicha especificidad.

No se sabe si el inhibidor de la PG afecta la producción de PG del patógeno. Otra de las incógnitas que surgió al estudiar a los inhibidores de PG es si estas moléculas inhiben de igual manera a la poligalacturonasa producida por el fruto durante el proceso de maduración.

Abu-Goukh, *et al.*, (1983a) reportan la incapacidad del inhibidor extraído y purificado de la pera para inhibir la actividad de la PG de la misma fruta *in vitro*; estos resultados sugieren que podría no existir un papel aparente del inhibidor en el control del proceso de maduración en peras y no explica las niveles bajos de actividad PG reportados por Weurman (1954).

Sin embargo, la purificación de los inhibidores I y II de la pera se ha basado en su actividad contra *A. niger* PG, siendo posible que exista un inhibidor de la poligalacturonasa involucrado en el proceso de maduración. Estos mismos investigadores reportan que los inhibidores de la PG extraídos de la pera se asemejan a algunas lectinas debido a que se unen reversiblemente con dextranos y aunque no aglutinan eritrocitos interfieren con la habilidad de la Concanavalina A para promover aglutinación. También sugieren que la disminución del inhibidor durante el desarrollo y crecimiento del fruto puede ser un aspecto en el cambio de balance de fuerzas a favor de patógenos, cuya actividad es más exitosa conforme los tejidos del hospedero maduran. Apoyan fuertemente la idea de que dicha correlación sugiere la importancia de los inhibidores de PG como una de las defensas vegetales, por lo menos en la pera, en contra de patógenos que producen pudrición (Abu-Goukh, *et al.*, 1983a).

Los resultados de Hoffman y Turner (1984) apoyan la hipótesis que establece que los inhibidores de PGs no son determinantes en el proceso de identificación de un patógeno, lo que propicia así una respuesta de acuerdo al tipo de interacción (compatible – incompatible) patógeno-huésped, ya que el inhibidor de PG extraído de *Pisum sativum* no discrimina entre las diferentes cepas del patógeno *Ascochyta pisi* inhibiéndolas, de modo que el grado de inhibición similar para cada una de las cepas. Estos autores también realizan un estudio cuyo objetivo es conocer si el inhibidor de PGs se localiza en semillas, pericarpio, tallo, foliolo y estipulas de *P. sativum* y si se halla en las mismas concentraciones, encontrando que en

todos los órganos examinados se detectó inhibidor de PG existiendo una variación cuantitativa ya que el inhibidor se encontró en concentraciones mayores en las estípulas y las hojas, mientras que la menor concentración fue encontrada en la semilla (Hoffman y Turner, 1984). Los mismos autores realizan la misma investigación con *P. vulgaris* y encuentran que las concentraciones mayores se localizan en el hipocótilo.

El primer trabajo que publica la presencia de actividad PGIP en cultivos de tejidos vegetales es el de Degrá, *et al.*, (1988). En su investigación encuentran que los callos de células de alfalfa (*Medicago sativa*) producen cantidades considerables de PGIP, dicha actividad fue mayor que la encontrada en hipocótilos y en hojas de la leguminosa. El inhibidor fue purificado por cromatografía por afinidad a través de un gel "Sepharose 4B" al cual se encontraba unida covalentemente la poligalacturonasa de *Aspergillus niger*. Este trabajo es importante porque el uso de callos de alfalfa en cultivos permite la preparación de cantidades mayores de PGIP haciendo más fácil el estudio de la estructura y función de este inhibidor. En el artículo también se subraya la necesidad de clonar el gen que codifica para la PGIP para su utilización como un recurso importante para la transformación de plantas más resistentes así como para dilucidar qué tipo de respuestas defensivas se pueden atribuir a la presencia de PGIP.

La PGIP extraída de *P. vulgaris* inhibe las poligalacturonasas producidas por *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum lindemuthianum* y *Aspergillus japonicus*, en cambio no inhibe la actividad de la endopoligalacturonasa producida por la bacteria *Erwinia carotovora* ni tampoco inhibe las endoPGs y exoPGs endógenas del jitomate, encino o pólen de sorgo. Sin embargo, sorprendentemente, inhibe la exopoligalacturonasa producida en el pólen de la planta del maíz. La PGIP debe reconocer e interactuar con una cierta estructura asociada con las enzimas a las cuales inhibe. Por ejemplo, la endoPG del

pólen de maíz debe poseer al menos una porción de su estructura similar a la de las endoPGs fúngicas. Al crearse anticuerpos en contra de éstas últimas enzimas, la exoPG del grano de pólen de maíz reaccionó con estos anticuerpos mientras que la endoPG proveniente del jitomate no fue reconocida (Cervone, *et al.*, 1990).

Plantas resistentes y susceptibles de *P. vulgaris* exhiben niveles similares de inhibidor (Lafitte, *et al.*, 1984), por lo tanto, las PGIPs no son consideradas determinantes en la resistencia o susceptibilidad de una planta. Los inhibidores aparentan tener un papel general reduciendo las actividades de PG producidas por patógenos, un papel que permite el aumento de las capacidades de transmisión de señales por medio del alargamiento del período durante el cual los oligourónidos activos están presentes en los sitios infectados (Cervone, *et al.*, 1989). Ante estas evidencias, Ryan y Farmer (1991), proponen que la manipulación genética revelaría el verdadero significado de las PGIPs.

En 1992, se clona y se caracteriza el gen que codifica para la PGIP de *P. vulgaris* (Toubart, *et al.*, 1992). Se realizan estudios con genes antisentido y sobreexpresión de PGIP con ayuda de la ingeniería genética.

Hay que hacer notar que quizá los niveles de PGIP en plantas resistentes y susceptibles no sean la variable crítica para poder determinar si las PGIP determinan resistencia o susceptibilidad, el trabajo de Lafitte, *et al.*, (1993), muestra que la actividad β -1,3-glucanasa es inducida en variedades resistentes de *P. vulgaris* antes que en variedades susceptibles de la misma especie ante la presencia de el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* cepa β .

La expresión transgénica de PGIPs provee de un sistema experimental en el cual se puede analizar el impacto de estos inhibidores en la resistencia vegetal ante el ataque del patógeno. La expresión del gen que codifica para la PGIP del fruto de la pera en plantas de

jitomate aumentó la resistencia a la colonización de *Botrytis cinerea in vitro*, indicando que la PGIP puede contribuir en las defensas del hospedero cuando se expresa en los frutos. En los frutos se ha encontrado que las PGIPs son un componente de los mecanismos de defensa preexistentes en la planta (Powell, *et al.*, 1994).

Hay que considerar que la PG no es la única enzima responsable de la degradación de la pared celular y por lo tanto la acción de la PGIP puede ser insuficiente para evitar totalmente la invasión del patógeno. Los patógenos producen una gran variedad de enzimas incluyendo isoformas de PG las cuales no son inhibidas por PGIPs y son inducidas en el patógeno gracias a fragmentos de la pared celular vegetal (Sharrock y Labavitch, (en prensa),; Podila, *et al.*, 1988). Por lo tanto el incremento en la expresión de PGIP en el fruto del jitomate maduro altera uno de los componentes de la degradación de la pared celular perteneciente al patógeno, retardando pero no necesariamente eliminando la colonización fúngica (Powell, *et al.*, 1994).

Ya en 1996 se empiezan a realizar estudios más profundos relacionados con la actividad de la PGIP y su interacción con la PG. Al llevarse a cabo mutaciones puntuales en la PG de *Fusarium moniliforme*, se encontró que el residuo histidina número 234 en la secuencia de aminoácidos es vital para las actividad enzimática de la enzima; sin embargo, no lo es para llevarse a cabo la unión con la PGIP (Caprari, *et al.*, 1996).

La identificación y aislamiento del gen que codifica para una PGIP en la frambuesa da una oportunidad para evaluar la resistencia poscosecha de esta baya ante el moho gris *Botrytis cinerea* (Graham, *et al.*, 1996).

Los transcritos de PGIP en *Phaseolus vulgaris* L. parecen acumularse según el estadio de desarrollo de la planta y la invasión del hongo *Colletotrichum lindemuthianum*

cepas α y γ . En hipocótilos etiolados, los niveles de transcriptos *pgip* fueron de 5 a 6 veces más altos que en hipocótilos desarrollados en presencia de luz (Devoto, *et al.*, 1997).

En *P. vulgaris*, la PGIP está codificada por una familia de genes, que comprende al menos 5 miembros y posiblemente 15 como máximo, organizados en un mismo locus (Frediani, *et al.*, 1993). Observaciones recientes indican que los diferentes miembros de la familia *pgip* codifican para proteínas con diferentes habilidades para reconocer endopoligalacturonasas fúngicas (Desiderio, *et al.*, 1997). El promotor del gen que codifica para una PGIP, llamado *pgip-1*, al ser utilizado para dirigir la expresión de la β -glucuronidasa (GUS) en plantas transgénicas de tabaco, se encontró activo en el estigma, las anteras y responde a lesiones mecánicas pero no a oligogalacturónidos, ácido salicílico o infección patógena. El patrón de expresión del gen no refleja el del resto de la familia de genes *pgip* (Devoto, *et al.*, 1998).

Dos miembros de la familia de genes *pgip* en *P. vulgaris* (*pgip-1* y *pgip-2*) se expresaron de forma separada en *Nicotiana benthamiana* obteniéndose que PGIP-1 no pudo interactuar con *F. moniliforme* pero sí con la PG de *A. niger*, PGIP-2 interactuó con ambas PGs fúngicas. Las dos proteínas son distintas una de la otra sólo por 8 aminoácidos. Al mutarse el aminoácido K253 de la PGIP-1 en el aminoácido correspondiente en la PGIP-2 (una glutamina), PGIP-1 adquirió la habilidad de interactuar con *F. moniliforme* (Leckie, *et al.*, 1999).

Se clonaron genes PGIP de la pera y del jitomate, para poder probar la hipótesis de que las PGIP contribuyen a la defensa vegetal. Se expresó el gen que codifica para la PGIP en la pera en jitomates transgénicos. Algunos, pero no todos las pruebas de resistencia ante la infección de *B. cinerea* en el jitomate indicaron que la PGIP de la pera contribuyó a la resistencia. Para evaluar por qué dichos resultados fueron tan variables, se llevaron a cabo

pruebas para conocer la habilidad de las PGIPs de inhibir PGs de diferentes patógenos y diferentes isoformas de la PG de *B. cinerea*. También se analizó la cantidad de PGs producidas por *B. cinerea* cuando infecta tejido de jitomates control y de jitomates transgénicos. Se postula que una de las causas por la cual se obtienen resultados que muestran que algunas PGIP pueden inhibir ciertas PGs y otras no, es que quizá el patógeno es capaz de producir isoformas de PG al percibir la presencia de PGIP. Los resultados de jitomates de invernadero y jitomates cultivados en el campo no aportan ninguna conclusión al estudio del papel de las PGIP. Se concluye que la contribución de estos inhibidores debe ser integrada con la expresión de otros mecanismos de defensa en la planta (Labavitch, *et al.*, 1998).

El desenvolvimiento de la confrontación entre un patógeno fúngica y su hospedero dependerá también de la flexibilidad de los mecanismos de infección del patógeno y claro ésta, del impacto del medio ambiente en la planta y el patógeno. El efecto importante de la PGIP que quizá contribuya a una defensa exitosa se debe presentar tempranamente en la interacción, contribuyendo al reconocimiento del patógeno invasor y retardando la digestión de la pared celular y la degradación de tejidos. La PGIP de la pera inhibe la PG proveniente de conidios de *B. cinerea*. Esta puede ser una interacción que podría determinar en qué circunstancias cierto inhibidor puede ayudar en la defensa vegetal. Ésto no puede aseverarse hasta que no se comprendan los factores bioquímicos que influyen la interacción PG-PGIP y cómo (si es que sucede) contribuye esta interacción a la activación de otras defensas en el huésped. Hasta entonces podremos utilizar el número creciente de genes PGIP clonados en estrategias propias de la ingeniería genética dirigidas hacia un mejoramiento de las defensas en plantas cultivadas (Labavitch, *et al.*, 1998).

Jitomates transgénicos expresando la PGIP de la pera fueron utilizados para demostrar que este inhibidor de endoPGs influencia el desarrollo de la infección del hongo *B. cinerea*. El crecimiento del hongo en el fruto maduro de jitomates transgénicos se redujo y la degradación de tejido disminuyó en un 15% comparado con los jitomates no transgénicos. En las hojas, la maceración del tejido se redujo en un 25% y la disminución de los síntomas de la infección fue similar a la observada por una cepa de *B. cinerea* la cual no produce endoPG (el gen *Bcpg1* ha sido suprimido). Se demuestra así que la expresión de la PGIP de la pera en el jitomate (que posee su propia PGIP) aminora la expansión de lesiones asociadas con la maceración del tejido ante la invasión de *B. cinerea* (Powell, et al., 2000).

Los modelos de evolución de codones para PGIPs de 22 dicotiledóneas y 19 PGs fúngicas indican que las sustituciones ventajosas dominan en la evolución molecular de estos genes y se identifican 9 residuos aminoácidos, los cuales parecen haber evolucionado adaptativamente en respuesta a selección natural. La mayoría de estos residuos se encuentran en la región banda- β /vuelta- β de la región abundante en leucina de las PGIPs, incluyendo dos sitios de los que se sabe alteran la especificidad de las PGIPs en frijol, otros residuos se encuentran fuera de esta región. Estos 9 aminoácidos se sugieren como nuevos blancos para la manipulación de la inhibición de PGs (Stotz, et al., 2000).

Interacciones proteína-proteína juegan un papel preponderante en la resistencia vegetal a enfermedades. Por ejemplo, los productos de los genes de resistencia vegetal (R) determinan el resultado de interacciones entre plantas y patógenos reconociendo e iniciando respuestas inducidas para cada producto del correspondiente gen de avirulencia (*avr*) en el patógeno. Una característica importante de muchos de los genes R es la existencia de una región con repeticiones abundantes en leucina (LRR) que está involucrada en la interacción proteína-proteína. Esta interacción es comúnmente muy específica, demostrándose hace poco la unión

directa de un producto de un gen *avr* con una proteína de resistencia que posee LRRs. Proteínas con LRRs se han encontrado también involucradas como proteínas de defensa vegetal pero no directamente relacionadas con el reconocimiento del patógeno, como las PGIPs. Aunque las PGIPs se unen a endopoligalacturonasas fúngicas parece que su interacción es menos específica que la observada entre el ligando y el producto de los genes R (Jones y Jones, 1963; Stotz, *et al.*, 2000).

IV.2. Pruebas preliminares de laboratorio, PGIP producida por *Medicago sativa* vs PG producida por *Lygus hesperus*

En el laboratorio de Fisiología Vegetal y Tecnología de Poscosecha, Pomología de la Universidad de California, Davis (EUA), del cual es titular el Dr. Labavitch, se estudia la PGIP producida por *Medicago sativa* que inhibe la PG de *L. hesperus* en cierto grado. En dicho laboratorio la autora realizó las siguientes pruebas en relación con la actividad del dicho inhibidor*:

1. Estabilidad del inhibidor. Se necesitaba saber si la actividad del inhibidor se mantenía después de congelar los extractos de alfalfa por más de 1 mes. Se encontró que el inhibidor es estable y se puede congelar por bastante tiempo.
2. Localización del inhibidor. Se realizaron extractos de diferentes órganos de la plantas de la alfalfa: primordios florales, hojas terminales, hojas del follaje, tallos, flores. Se encontró que la mayor actividad inhibitoria se localiza en las flores, botones florales y hojas terminales. Tambi[en se detect{o actividad PG en botones florales.
3. Cuantificación del tejido vegetal. El objetivo de este estudio fue el realizar extractos con tejido vegetal de distinto peso, y llevar una prueba de actividad inhibitoria para saber

donde ésta se estabilizaba y era máxima. Se encontró que el peso no determina la actividad inhibitoria y por lo tanto la actividad inhibitoria de 0.3 g de tejido vegetal es igual a la actividad presente en 3 g.

4. Determinación del tiempo de actividad del inhibidor. Se colectaron muestras de botones florales y hojas terminales de alfalfa a diferentes horas del día, para saber si la actividad inhibitoria se acumulaba en alguna hora en particular. No se encontraron diferencias considerables en la actividad inhibitoria a diferentes horas del día.
5. Variabilidad entre un mismo individuo. Se tomaron 5 ápices (que incluían: hojas terminales y botón floral) de una misma planta de alfalfa y se analizó su actividad; no existieron diferencias considerables.
6. Actividad durante el desarrollo. Se recolectaron muestras de cotiledones, hojas unifoliadas, hojas del follaje, hojas terminales de dos variedades de alfalfa en diferentes estadios de desarrollo (6, 5, 4, 3, 2, 1 semana(s) de crecimiento). La actividad PGIP parece incrementarse al crecer la planta.
7. Actividad en diferentes variedades. Sabiendo lo anterior se llevaron a cabo análisis para comparar la actividad inhibitoria presente entre diferentes variedades de alfalfa y los resultados mostraron que existe bastante variabilidad.
8. Germinado de alfalfa. Se encontró actividad endógena PG en hipocótilos y cotiledones de alfalfa.

*La PG utilizada para las pruebas fue la PG producida por *L. hesperus* extraída del tubérculo de la papa (ver Sección 11.2).

Lygus hesperus también es un parásito del algodón por lo tanto se analizaron también muestras de diferentes órganos de la planta del algodón provenientes de diferentes variedades. La variedad Maxa mostró una mayor inhibición de la PG de *L. hesperus*. No se encontró actividad PG endógena en las muestras.

Se debe recalcar que los resultados de los análisis arriba descritos son preliminares y aún no se ha realizado un análisis estadístico de los datos.

Por último, podría preguntarse el lector si se han encontrado inhibidores de otras enzimas producidas por patógenos cuya función tenga cierta similitud con las PGIPs. La respuesta es afirmativa, en 1995 se purificó y caracterizó una pectinmetilesterasa (PME) a la par de su inhibidor provenientes de *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* variedad Katahdin. El inhibidor se encontró activo deteniendo la actividad de PME de varias especies de plantas pero no proveniente de bacterias u hongos. Su actividad inhibitoria se perdió al ser tratado con PG y pectinliasa. Estudios de la cinética de la reacción, muestran que el inhibidor posee un modo incompetitivo de inhibición. El inhibidor de la PME se encontró en 5 genotipos diferentes mostrándose en una concentración mayor en aquellos resistentes a podredumbres causadas por patógenos del género *Erwinia* (McMillan y Pérombelon, 1995).

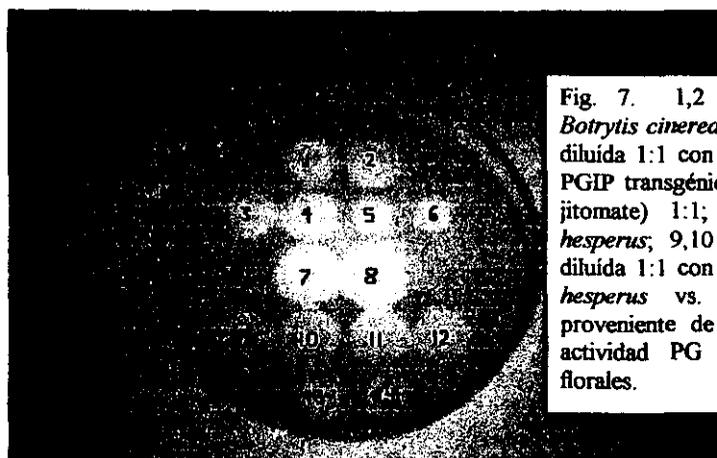


Fig. 7. 1,2 actividad poligalacturonasa de *Botrytis cinerea*; 3,4 actividad poligalacturonasa diluida 1:1 con agua; 5,6 PG de *B. cinerea* vs. PGIP transgénica (PGIP de la pera y PGIP del jitomate) 1:1; 7,8 actividad PG de *Lygus hesperus*; 9,10 actividad PG de *L. hesperus* diluida 1:1 con agua; 11,12 actividad PG de *L. hesperus* vs. PGIP de *Medicago sativa* proveniente de primordios florales 1:1; 13,14 actividad PG de *M. sativa* en primordios florales.

CAPÍTULO V. Análisis de la información presentada

V.1. Análisis

Con respecto a las investigaciones generadas alrededor de la PGs, se hace notar que los propios resultados fueron marcando la pauta de nuevos enfoques. Por ejemplo, poco después de descubrirse las pectinasas como enzimas producidas por patógenos, se consideraron responsables de la patogenicidad de esos organismos. En cierta manera se ve exagerada la importancia de dichas enzimas en la interacción huésped-patógeno. Poco a poco, con resultados confusos, se empezó a sugerir que quizá las poligalacturonasas no son las únicas responsables para determinar si una interacción es compatible o incompatible.

Desde 1970 se han llevado a cabo investigaciones para comprender la estructura y el mecanismo por medio del cual ciertas enzimas degradan la pared celular. Grandes esfuerzos también se han enfocado en el esclarecimiento de las bases moleculares de la composición y conformación de unidades individuales de carbohidratos en el sustrato para el reconocimiento proteínico. Es necesario saber si hay una secuencia única en el polisacárido que confiera un reconocimiento específico de la isoenzima y si esta especificidad juega un papel importante en las interacciones patógeno-planta hospedera. Un ejemplo claro y de cierto éxito es el de la liasa pectato C, que es una enzima secretada por la bacteria *Erwinia chrysanthemi*. Las investigaciones alrededor de la liasa de pectato demuestran cómo la información acerca de la estructura molecular de la enzima ha contribuido en demasía para entender el reconocimiento

entre moléculas y el mecanismo de anclaje de la enzima y por lo tanto ha permitido un mejor entendimiento del mecanismo de virulencia de este patógeno (Herron, *et al.*, 2000).

El mecanismo de las interacciones entre agente patógeno-planta hospedera todavía no ha sido esclarecido del todo. Sin embargo, al menos en *Erwinia chrysanthemi* la organización genética y la regulación de las sacaridasas ya han sido elucidadas. A su vez se ha encontrado que muchos organismos patógenos secretan isoenzimas múltiples de la misma enzima pero cuya transcripción de genes es por lo regular regulada independientemente.

Para el caso concreto de la pectato liasa C (Pel C) se ha postulado que la importancia de producir múltiples isoenzimas por parte del patógeno radica en la heterogeneidad del sustrato. La unidad de la matriz de pectato es el ácido galacturónico, el carbono 6 de esta unidad es frecuentemente esterificado con un grupo metilo, la metilación neutraliza la carga negativa del conjunto de ácidos urónicos y por lo tanto altera la carga superficial del polímero de pectato. Existen diferentes niveles de metilación en el componente de pectato. Así es como un patógeno que secreta un mayor "arsenal" de enzimas pécticas, cada una de las cuales utiliza un mecanismo similar de catálisis pero reconoce una secuencia diferente de unidades oligolacturonato metilados y sin metilar, tendrá un rango mayor de hospederos (Herron, *et al.*, 2000).

La misma historia se repite para el caso de la poligalacturonasa endógena y su importancia en la maduración del fruto. Primero se le otorga un papel primordial a la enzima y después se va reconociendo que no sólo la poligalacturonasa es importante, sino que el proceso conlleva la interacción de varias moléculas y que dicho proceso también difiere según la especie vegetal de la cual se trate.

Un estudio tan intenso similar al de la pectato liasa C sería deseable para dilucidar de manera más eficaz el papel de la endopoligalacturonasa tanto en patogénesis como en los

**ESTA TESIS NO SAI
DE LA BIBLIOTECA**

diversos procesos fisiológicos vegetales en los cuales está involucrada. Debemos reconocer que el principio de este arduo estudio ya se está llevando a cabo y que día a día se hacen esfuerzos para traer a la luz la organización genética, regulación, patrones de glucosilación, etc., de la enzima.

El descubrimiento de que la acción de las poligalacturonasas al producir oligogalacturónidos de cierta longitud hacían aparecer ciertas defensas vegetales da pauta a la interpretación del papel de las PGIPs como parte del mecanismo de defensa de la planta. Investigadores italianos de este modo, exponen su hipótesis de que las PGIPs son piezas de todo un mecanismo defensivo en la planta que bien podría determinar la resistencia de ciertas plantas o variedades de plantas ante la invasión de un agente patógeno. Sin embargo, la importancia de las PGIPs en la interacción huésped-patógeno parece ser sobrestimada ya que los estudios *in vivo* no sustentan el optimismo de los resultados *in vitro*. Al intensificarse el estudio de los inhibidores de PGs se les han atribuido nuevas funciones, las cuales en su mayor parte faltan por ser respaldadas con más investigaciones. Una caracterización completa de las familias genómicas *pgip* es necesaria, al igual que un análisis bioquímico y molecular de cada una de las proteínas para las cuales codifican. A la par de los experimentos a nivel molecular es prioritario el análisis *in vivo* para entender de una manera más generalizada el papel de estos inhibidores.

El mejoramiento genético de plantas para incrementar la calidad de frutos está dirigido hacia la obtención de mejores caracteres físicos (tamaño, maduración homogénea, cáscara fuerte, facilidad en la cosecha mecánica, producción de jugo, durabilidad al almacenar), caracteres químicos (color, contenido vitamínico, niveles de azúcar, componentes nutricionales) y caracteres sensoriales (sabor, aroma, sensación en la boca). Los métodos biotecnológicos para mejorar la calidad frutal incluyen la manipulación de genes relacionados

con el proceso de maduración y genes PGIP para el control de patógenos como *Botrytis cinerea*. Fluctuaciones genotipo-ambiente se interponen en estos métodos, reduciendo la calidad de los nuevos genotipos desarrollados tanto por biotecnología como por selección artificial (Brennan, *et al.*, 1999).

Algo que no se ha comprobado experimentalmente es la interacción de las PGIPs y las PGs, ambas de origen vegetal, ¿existirá cierta interacción entre los inhibidores y dichas poligalacturonasas vegetales?, ¿será posible que en ciertos estadios de crecimiento las PGIPs inhiban las PGs vegetales y que esta interacción esté regulada fisiológicamente?. También sería interesante la comparación de los genes que codifican para PGs de origen vegetal y para las producidas por patógenos e insectos, para así entender por otra medio la especificidad de las PGIPs.

Otro punto importante a resolver, es la manera en que las PGIP permiten la transducción de señales y qué otras moléculas están relacionadas al mecanismo.

La información obtenida en el laboratorio de Fisiología Vegetal y Tecnología de Poscosecha es preliminar; no obstante, hay que hacer notar que las investigaciones realizadas en este momento en la Universidad de California, Davis, EUA van un paso adelante. Hasta ahora la información se relaciona con las PGIPs y las PGs producidas por patógenos (bacterias y hongos) y no con PGIPs y PGs producidas por insectos. Ésto abre una nueva ruta para la lucha en contra de plagas en el campo agrícola.

En lo que respecta a los resultados obtenidos en el laboratorio se pueden formular las siguientes incógnitas en relación con la PG endógena: ¿cuál es la función de la poligalacturonasa endógena presente en el botón floral de *M. sativa*?, ¿será relativa a la organogénesis como se ha demostrado en otras zonas meristemáticas?, ¿será la función de

la PG endógena encontrada en plántulas de *M. sativa* similar a la encontrada por Peretto, et al., (1992) en las raíces laterales de *A. porrum*?

En relación con la PG producida por *Lygus hesperus* todavía se debe probar si esta enzima es el factor que determina la muerte de los botones o yemas florales en *M. sativa*. También hacen falta mayores investigaciones para conocer el número de isoenzimas presentes en las glándulas salivales, cuáles son inhibidas por la PGIP de *M. sativa*, su diferenciación con la PG del intestino, sus características bioquímicas, su localización en un mapa genómico.

De la misma manera se necesitan más datos sobre la naturaleza bioquímica y molecular del inhibidor en la alfalfa. Obviamente, también se necesitan investigaciones *in vivo* para poder aseverar si el inhibidor confiere cierta resistencia a la planta de alfalfa ante el ataque del insecto o si su presencia es principalmente para regular la acción de la PG vegetal.

V. 2. Importancia

La investigación bibliográfica actualizada, su traducción y su condensación en revisiones es esencial ya que representa una gran herramienta en la generación de conocimiento. Para poder un proyecto se necesita conocer el tema y conocer las investigaciones que se han hecho al respecto. El trabajo experimental puede ser excelente pero debe estar construido sobre las bases de una buena revisión bibliográfica que permita cometer los errores mínimos, esclarecer incógnitas y por lo tanto dar lugar a una buena investigación que aportará algo nuevo al conocimiento biológico.

La revisión bibliográfica aquí presentada da una visión de lo que se está realizando actualmente y lo que se ha generado en los últimos años alrededor de un tema tan reciente y

en boga como es el de las enzimas poligalacturonasas y sus inhibidores glicoproteínicos. Se presenta la transición en los temas de investigación y cómo nuevas preguntas se fueron generando para descubrir gradualmente el papel de estas glicoproteínas inhibidoras en las interacciones patógeno-planta huésped. Este tema es de gran importancia para el mejoramiento de cultivos y el mantenimiento de frutos en el almacén. El conocimiento de los mecanismos de defensa en las plantas cultivadas nos abre otra posibilidad para contrarrestar a los patógenos de una forma más eficaz, utilizando las propias defensas naturales de las plantas, ya sea seleccionándolas artificialmente o mejorándolas por métodos transgénicos, aunque éstos últimos se encuentren inmersos actualmente en un gran debate (Chrispeels, 1994).

La realidad es, que con o sin la aprobación del consumidor se producen y se continúa con la producción de plantas transgénicas que poseen un "genotipo mejorado". En este aspecto hay que considerar quiénes se beneficiarían de la ingeniería genética de plantas. Es obvio que los objetivos y las metas alcanzadas en esta rama de la Biología se han producido y son diseñados para los países de primer mundo ya que la biotecnología se ha desarrollado en países como: Japón, Estados Unidos de Norteamérica y los de Europa occidental. Aunado a lo anterior, el desarrollo de dicha biotecnología será controlada por las grandes industrias de dichos países, que otorgan el financiamiento necesario para la investigación. Por lo tanto, los beneficiarios de las nuevas plantas producidas, serán los habitantes de los países desarrollados, no los campesinos tercermundistas quienes practican agricultura de autoconsumo y cuyas necesidades son diferentes (Chrispeels, 1994).

Los países del Tercer Mundo podrían beneficiarse de plantas mejoradas resistentes a virus, patógenos e insectos, ya que esto significaría una reducción en el uso de pesticidas, y los pesticidas son costosos y dañan el ambiente. Sin embargo, la distribución de semillas a

dueños de pequeños pedazos de tierra y a campesinos que viven de su cosecha es de gran dificultad. Se beneficiarían sólo los agricultores que poseen territorios extensos de tierra y que cultivan el jitomate, maíz, que son plantas de gran importancia económica hacia las cuales los adelantos biotecnológicos se han enfocado. No se está tratando de mejorar la casava o el camote, que son productos de primera necesidad en África. Otro problema es que no hay manera de transmitir los beneficios de la biotecnología agrícola al Tercer Mundo ya que no existe una industria de la semilla en dichos países. En los países desarrollados, las compañías de semillas producen híbridos de semillas o líneas selectas y su distribución eficiente asegura que los agricultores tengan acceso a las líneas mejoradas más recientes con producciones más altas. Pero en países subdesarrollados casi no existen industrias de semillas y la mayoría de los agricultores tienen que apartar parte de su semillas para sembrarla el próximo año. Por lo tanto la distribución de semillas mejoradas genéticamente será difícil (Chrispeels, 1994).

La mayoría de las industrias de semillas son dueñas también de compañías agroquímicas; por lo tanto su meta es producir semillas transgénicas que sean compatibles con los químicos que producen. El dinero que se utiliza en la investigación proviene de las concesiones de estas industrias, por lo tanto la investigación que se produce favorecerá la evolución de un sistema agrícola dominante cuya dirección apunta hacia una agricultura que necesita alta contribución de dinero, por lo tanto no es sustentable. Ésto afectará la economía de los países subdesarrollados (Chrispeels, 1994).

Se dice que nuestro México ya no se considera un país de Tercer Mundo sino uno en vías de desarrollo. Mi opinión es que si ésto es cierto, debemos promover con ahínco el desarrollo de la biotecnología en el país y tener una mejor noción de las investigaciones y el nivel en el que se encuentran las investigaciones relacionadas con la transformación genética

de plantas y la utilización de la biotecnología para el mejoramiento de cultivos, así como de la información acerca de las interacciones plantas hospederas-patógenos. Hay que hacer resaltar que no sólo la biotecnología debe ser impulsada sino todas las ramas de la Biología a la par, incluyendo a la Taxonomía como una de las más importantes. Nuestro país es uno de los más biodiversos, por lo tanto en nuestro territorio poseemos el germoplasma del cual se puede echar mano para la producción de plantas más resistentes. Esto significa que necesitamos, primero, proteger zonas de mayor diversidad, impulsar el trabajo taxonómico para identificar las especies y describir nuevas, para entonces poder realizar investigaciones en biotecnología que nos permitan mejorar nuestras plantas cultivadas y competir con productos superiores a la par de los países de Primer Mundo. Esta tarea, no es fácil, también se necesita la ayuda de industrias y la integración de más compañías que produzcan semillas y las distribuyan en el país. Repito, la tarea no es fácil, pero quizá esta revisión bibliográfica aporte un granito de arena y permita seguir caminando por dichas vías hacia el desarrollo.

CONCLUSIONES

PRIMERA.- Los inhibidores glicoproteínicos de poligalacturonasas (PGIPs) son moléculas de reciente descubrimiento, cuyas características y funciones putativas son diversas y de las que se necesita mayor información.

SEGUNDA.- Una de las hipótesis más importantes en relación a su función es la que plantea que las PGIPs son vitales para contrarrestar la invasión de un agente patógeno al utilizar las mismas enzimas producidas por el invasor para la producción de evocadores, que a su vez hagan aparecer respuestas defensivas en la planta.

TERCERA.- Para determinar la importancia de estos inhibidores, la ingeniería genética provee de un sistema experimental invaluable con el cual se puede analizar el verdadero impacto de las PGIPs que sufre la resistencia vegetal ante el ataque de insectos o patógenos.

CUARTA.- El conocimiento científico del papel de las PGIPs depende enormemente de los avances e investigación en relación con las PGS y los evocadores de defensas vegetales. Se necesita hacer estudios que tomen en cuenta estos tres factores para esclarecer de manera más específica, la interacción de una cierta planta huésped y un agente patógeno.

QUINTA.- Como se ha pretendido demostrar en esta revisión, existen evidencias que muestran la importancia y la existencia de las PGIPs como medio de defensa vegetal, sin embargo, hay que considerar que las PGIPs forman parte de todo un complejo y diverso mecanismo de defensa y su presencia aislada, no nos asegura que una planta sea resistente o susceptible a un patógeno.

SEXTA.- La biología molecular ayuda a interpretar la estructura de los diferentes inhibidores glicoproteínicos de poligalacturonasas, con lo que podremos averiguar si en verdad poseen una función de reconocimiento en la interacción pólen-estigma y en el sistema de autocompatibilidad y otra función en la transducción de señales.

SÉPTIMA.- El fomento de las investigaciones y su seguimiento relacionados con los ~~inhibidores de defensa vegetal~~ ~~son~~ ~~de~~ ~~gran~~ ~~importancia~~ ~~en~~ ~~el~~ ~~mejoramiento~~ ~~genético~~ ~~de~~ ~~plantas~~ ~~...~~ ~~cultivadas~~.

OCTAVA.- Nuestro país posee una gran diversidad genética, que debe ser protegida y aprovechada para la producción de variedades resistentes a patógenos e insectos-plaga, que beneficien a nuestro campesino.

NOVENA.- Las investigaciones en Fisiología Vegetal, Biología Molecular, Fitopatología y Taxonomía alrededor de los mecanismos de defensa vegetal, deben aumentarse para lograr el objetivo de la conclusión anterior, y de esta manera, no quedamos atrás en los logros para obtener variedades resistentes que fortalezcan nuestra producción agrícola y así cubrir la distancia que marca la desventaja que tenemos ante los países de primer mundo.

PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN:

Formación de flores en *Medicago sativa* L. (alfalfa) var. Moapa 69 regulada por la actividad poligalacturonasa endógena *in vitro*

María de la Paz Celorio Mancera
Universidad Nacional Autónoma de México

Introducción

El cultivo de tejidos, órganos y células individuales puede ser orientado hacia la formación de raíces, tallos, flores o plantas completas, demostrando así la totipotencialidad de las células vegetales (Marfá, *et al.*, 1991).

A la fecha hay bastante información en torno a la organogénesis en plantas. Se sabe, por ejemplo, que las concentraciones de auxina y citoquinina en un medio líquido son suficientes para determinar el tipo y número de órganos formados por cada tejido vegetal en cultivo (Mohnen, *et al.*, 1990).

Sin embargo, conforme el conocimiento científico aumenta, se proponen nuevas moléculas como reguladoras de la organogénesis.

La poligalacturonasa (PG) producida por ciertos patógenos es una enzima que ha sido utilizada para la obtención de fragmentos provenientes de paredes celulares o pectinas purificadas. Dichos fragmentos, en concreto, moléculas llamadas oligosacarinas, están involucradas en la organogénesis (Marfá, *et al.*, 1991; Hahn, *et al.*, 1993).

Las poligalacturonasas producidas por las mismas plantas parecen tener un papel dentro de los procesos de autoincompatibilidad y de morfogénesis. Aún falta mucha investigación en torno a estos temas para corroborar esta información (Salvi, *et al.*, 1990; Bellincampi y Salvi, 1993).

Al presentar este protocolo de investigación, se pretende, contribuir al conocimiento de la función de las poligalacturonasas de origen vegetal en la regulación indirecta de formación de flores en *Medicago sativa* por medio de la acción de la PG endógena producida por la planta y como su sustrato, a las paredes celulares de *M. sativa* y pectina purificada.

Lo anterior se plantea para generar conocimiento acerca del papel de las poligalacturonasas de origen vegetal, ya que éste es indispensable para entender mejor la fisiología de las plantas y así aprovechar esa información para aplicarla en ramas como la Agronomía, Fitogenética, etc. Aunado a lo anterior, se incrementaría el control de los cultivos vegetales *in vitro*.

También podemos extrapolar dicho conocimiento para entender la función biológica de otras moléculas, como los antagonistas de las PGs, los inhibidores glicoproteínicos de poligalacturonasas (PGIPs), también producidos en los sistemas vegetales. Hasta ahora se han realizado bastantes investigaciones en torno a las poligalacturonasas producidas por patógenos como *Erwinia* sp., *Botrytis* sp., *Aspergillus* sp., etc. y sus antagonistas PGIPs vegetales (Cervone, *et al.*, 1986; Powell, *et al.*, 2000). Se pretende con estas investigaciones, sacar provecho de las PGIPs como posibles factores de resistencia ante cierto patógeno o insecto, generando así variedades de plantas de importancia económica mejoradas genéticamente. No obstante, falta resolver muchas incógnitas que resolver en torno al complejo PG vegetal-PGIP vegetal y su función *in planta* en primera instancia.

Marfá, *et al.*, (1991) publicaron que los oligogalacturónidos obtenidos por degradación enzimática de la PG de *Aspergillus niger* inducen la formación de flores en cultivos de tejidos de la planta del tabaco. Hasta hoy no se ha publicado que una poligalacturonasa de origen vegetal induzca la formación de flores *in vitro*.

A partir de los resultados de este estudio se podrán sugerir nuevas hipótesis que ayuden a entender el papel de las PGIPs de origen vegetal.

Antecedentes

En *Phaseolus vulgaris* se ha encontrado que los niveles más altos de PG se encuentran en el ápice vegetativo y en la flor (Salvi, *et al.*, 1990).

En los estudios preliminares relacionados con la interacción de PGIP de *M. sativa* y la PG de *Lygus hesperus* (Heteroptera; Miridae) realizados en la Universidad de California, Davis, se obtuvieron resultados similares a los de Salvi, *et al.*, (1990) ya que los niveles más altos de PG endógena en *M. sativa* se encuentran en los primordios florales y en las flores (Teuber, comunicación personal).

Marfá, *et al.*, (1991) encontraron que los oligogalacturónidos con un grado de polimerización de 12 a 14, estimulan la formación de flores en cultivos de tejidos de plantas de tabaco. Apoyando los resultados ya descritos, se sabe que los oligosacáridos son activos en más de una función vegetal (Albersheim, *et al.*, 1983).

También se han encontrado genes que codifican para proteínas extracelulares con repeticiones de leucina en su configuración (característica importante de las PGIPs), como el gen *FIL2* que se expresa en flores y especialmente en filamentos, anteras y estigma. Estos resultados sugieren que dicho gen podría estar vinculado con el sistema de autoincompatibilidad o en morfogénesis como algunas proteínas abundantes en leucina encontradas en animales (Steinmayr, *et al.*, 1994). La presencia de estos inhibidores sugiere, por lo tanto, la existencia de una PG de origen vegetal y su posible regulación por la PGIP.

Objetivos

- Saber si existe una relación entre la poligalacturonasa producida por *M. sativa* y la formación de flores *in vitro*.
- Sugerir, sobre la base de los resultados por obtener, el posible papel de la PGIP y su relación con la PG, siendo ambas moléculas producidas por *M. sativa*.

Materiales y Métodos

1. Obtención de la poligalacturonasa producida por *Medicago sativa* variedad Moapa 69.

Extracción. Se recolectarán los botones florales de plantas de seis semanas de edad cultivadas en el invernadero. La maceración de este material vegetal se llevaría a cabo, preferentemente, inmediatamente después de la recolecta manteniendo a los primordios florales en refrigeración (4°C) durante su traslado y retención en el laboratorio. La maceración se realizará respetando una relación entre tejido y solución amortiguadora de 1g/5ml. La solución amortiguadora para la extracción sería de acetato de sodio pH 5, 0.1M, 3M NaCl, 0.1M 2-mercaptoetanol, 5% p/v polivinilpirrolidona. Se mantendrá el extracto en constante

homogeneización con un agitador magnético a temperatura ambiente, por una noche. Posteriormente, se centrifugará por 15 minutos a 16 000 rpm. El sobrenadante puede estar sujeto a una filtración si así lo requiere. El extracto resultante será sometido a una purificación.

Purificación. En primer lugar se utilizará la técnica de la placa de agar descrita por Dingle, *et al.*, (1953), para saber si el extracto presenta actividad poligalacturonasa. Corroborada la existencia de la enzima se procederá a correr 1ml de extracto en columnas cromatográficas usando el gel Sephacryl S-200HR. La columna será previamente calibrada con proteínas estándares (como el Citocromo C) y con la solución amortiguadora utilizada en la extracción. Las fracciones recolectadas de cada columna serán sometidas a una prueba de acción enzimática, nuevamente utilizando la técnica de la placa de agar. Las fracciones que muestren actividad enzimática poligalacturonasa serán combinadas en un solo volumen y sometidas a diálisis, concentración o sublimación si es necesario.

Concentración de la enzima. Para determinar la concentración de la poligalacturonasa a utilizar, se medirá por medio de un ensayo para concentración de proteínas, utilizando como estándar la proteína BSA ("bovine serum albumin") y el reactivo colorante azul de Coomassie (Cervone, *et al.*, 1987). Idealmente se utilizarían 40 unidades de enzima por cada gramo de pared celular como lo marca Marfá, *et al.*, (1991).

2. Obtención de los sustratos.

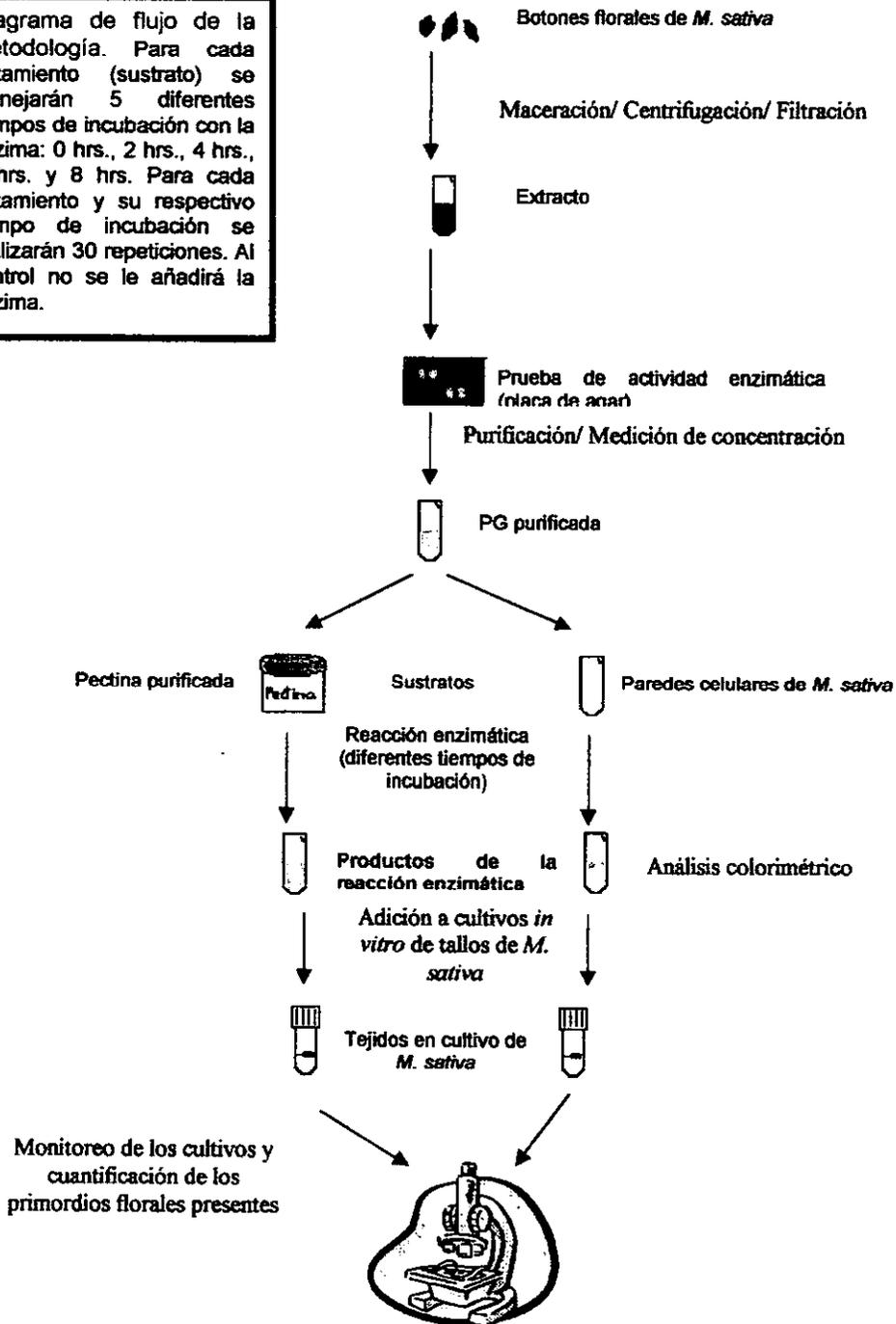
Pectina purificada. Existen pectinas purificadas provenientes de paredes vegetales que pueden ser obtenidas sin ningún problema de un proveedor de productos bioquímicos. En este caso se obtendrá de "Sigma".

Paredes celulares de *M. sativa* variedad Moapa 69. En este caso se utilizarán hojas de plantas adultas de *M. sativa*, las cuales serán maceradas en una relación de 2 gramos de tejido por 50 mililitros de agua destilada. El material insoluble será recolectado por medio de un filtro de fibra de vidrio. Este material se lavará con 50 ml de agua destilada y se llevará a cabo la técnica descrita para la obtención de paredes celulares señalada por Cervone, *et al.*, (1987).

3. **Cultivo de tejidos de *M. sativa* variedad Moapa 69.** Capas finas de tejido (explantes) de aproximadamente 1mm de grosor serán seccionadas de tallos adultos provenientes de plantas (6 semanas de edad) de la especie y variedad mencionadas. Las capas serán a su vez divididas a lo largo, a espacios de 10mm y ubicadas en medio de Linsmaier y Skoog conteniendo 107 mM de glucosa, adicionado con 1.5 μ M de ácido indolbutírico. El pH se ajustará a 5.8 con KOH o HCl (Marfá, *et al.*, 1991).

4. **Tratamientos.** La enzima poligalacturonasa extraída de los botones florales de *M. sativa* var. Moapa 69, se incubará con la pectina purificada y las paredes celulares de alfalfa a una temperatura de 37°C durante 0, 2, 4, 6 y 8 horas, utilizando NaBO₄ para detener la reacción a los diferentes tiempos. Se realizarán análisis colorimétricos de antrona (para azúcares neutros) y de ácido urónico (para pectina no esterificada) para cada hora y cada tratamiento con la finalidad de conocer el porcentaje y naturaleza de los fragmentos obtenidos de la reacción enzimática. Las muestras que contienen los carbohidratos resultantes de la degradación serán disueltas en un volumen igual de agua y esterilizadas por filtración utilizando una membrana de 0.2 μ m. Se asignarán aleatoriamente los cultivos a cada tratamiento. Las muestras serán añadidas al medio de cultivo donde se encuentran creciendo los tejidos de *M. sativa* y serán incubados a 24°C bajo condiciones luminosas. Los cultivos serán monitoreados continuamente y como límite de tiempo, después de 23 a 24 días de cultivo, los primordios florales presentes serán cuantificados bajo un microscopio de disección (Marfá, *et al.*, 1991). Cada tratamiento tendrá un número mínimo de 30 repeticiones. Al control se le añadirá un volumen en agua destilada similar al añadido a los demás tratamientos. A continuación se muestra diagrama de flujo que ilustra la concatenación de eventos necesarios dentro de la metodología.

Diagrama de flujo de la metodología. Para cada tratamiento (sustrato) se manejarán 5 diferentes tiempos de incubación con la enzima: 0 hrs., 2 hrs., 4 hrs., 6 hrs. y 8 hrs. Para cada tratamiento y su respectivo tiempo de incubación se realizarán 30 repeticiones. Al control no se le añadirá la enzima.

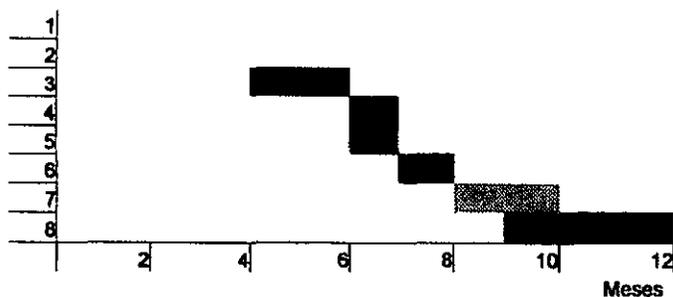


5. **Análisis de los resultados.** Se propone realizar gráficas que muestren el promedio de primordios generados en cada tratamiento (sustrato-tiempo de reacción) para analizar si los datos siguen una distribución normal y así obtener media, desviación estándar, varianza y coeficiente de variación para cada distribución. Se aplicará, entonces, un análisis de varianza, con un 95% de confianza. La hipótesis nula sería que dichas varianzas son iguales, mientras que la alterna postularía que la varianza de por lo menos un tratamiento es mayor a la del control.

Aunado a lo anterior se podrá representar de manera gráfica los valores promedios de primordios florales obtenidos en relación al tiempo de incubación dentro de cada sustrato.

6. **Duración y secuencia del proyecto.** Se calcula que la duración del proyecto sea de un año. La siguiente gráfica de Gantt (Méndez-Ramírez, *et al.*, 1990) describe en forma concreta la secuencia de actividades y su duración a lo largo de dicho periodo:

Actividades



1. Siembra de *M. sativa* var. Moapa 69
2. Obtención de la enzima PG
3. Obtención de los sustratos
4. Cultivo de tejidos de *M. sativa*
5. Reacción enzimática y análisis colorimétricos
6. Organogénesis (formación de primordios florales)
7. Cuantificación de primordios
8. Análisis estadístico y publicación

Bibliografía

1. Albersheim, P., Darvill, A. G., McNeil, M., Valent, B. y J. K. Sharp. 1983. Oligosaccharins, naturally occurring carbohydrates with biological regulatory functions. *In* O. Ciferri y L. Dure (eds), *Structure and Function of Plant Genomes*. Plenum, New York, p. 293-312.
2. Bellincampi, D. y G. Salvi. 1993. Oligogalacturonides inhibit the formation of roots on tobacco explants. *The Plant Journal* 4(1): 207-213.
3. Cervone, F., De Lorenzo, G., Degra, L. y G. Salvi. 1986. Interaction of fungal polygalacturonase with plant proteins in relation to specificity and regulation of plant defense response. *In* B. Lugtenberg (ed), *NATO ASI Series. Recognition in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Interactions*. H4. Springer-Verlag, Berlín, p. 253-258.
4. Cervone, F., De Lorenzo, G., Degra, L. y G. Salvi. 1987. Elicitation of necrosis in *Vigna unguiculata* Walp. by homogeneous *Aspergillus niger* endopolygalacturonase and by α -D-galacturonate oligómeros. *Plant Physiol* 85: 626-630.
5. Dingle, J., Reid, W. W. y G. L. Solomons. 1953. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. II* Application of the 'Cup-plate' Assay to the Estimation of Enzymes. *J Sci Food Agric* 4: 149-155.
6. Hahn, M. G., Cheong, J., Alba, R., Enkerli, J. y F. Coté. 1993. Oligosaccharide elicitors: structures and recognition. *In* B. Fritig, M. Legrand (eds), *Mechanisms of Plant Defense Responses*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 99-116.
7. Marfá, V., Gollin, D. J., Eberhard, S., Mohnen, D., Darvill, A. y P. Albersheim. 1991. Oligogalacturonides are able to induce flowers to form on tobacco explants. *The Plant Journal* 1(2): 217-225.

8. Mohnen, D., Eberhard, S., Marfá, V., Doubrava, N., Toubart, P., Gollin, D. J., Gruber, T., Nuri, W., Albersheim, P. y A. G. Darvill. 1990. Control of root, vegetative shoot and flower morphogenesis in tobacco thin-cell-layer explants. *Development* 108: 191-201.
9. Méndez-Ramírez, I., Namihira-Guerrero, D., Moreno-Altamirano, L. y C. Sosa de Martínez. 1990. El protocolo de Investigación: lineamientos para su elaboración y análisis. Trillas, México. 210 pp.
10. Powell, A. L. T., Van Kan, J., Ten Have, A., Visser, J., Greve, L. C., Bennett, A. B. y J. M. Labavitch. 2000. Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Mol Plant-Microbe Interact* 13(9): 942-950.
11. Salvi, G., Giarrizzo, F., De Lorenzo, G. y F. Cervone. 1990. A polygalacturonase inhibiting protein in the flowers of *Phaseolus vulgaris* L. *J Plant Physiol* 136: 513-518.
12. Steinmayr, M., Motte, P., Sommer, H., Saedler, H. y Z. Schwarz-Sommer. 1994. *FIL2*, an extracellular leucine-rich repeat protein, is specifically expressed in *Antirrhinum* flowers. *The Plant Journal* 5(4): 459-46
13. Stotz, H. U., Contos, J. J. A., Powell, A. L. T., Bennett, A. B. y J. M. Labavitch. 1994. Structure and expression of an inhibitor of fungal polygalacturonases from tomato. *Plant Molecular Biology* 25: 607-617.
14. Teuber, L. Professor. Agronomy and Range Science. 111 Hunt Hall. University of California, Davis, USA.

ABREVIATURAS*

aa.- aminoácidos.

ACC.- 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico.

ADN.- ácido desoxiribonucleico (DNA, "desoxiribonucleic acid").

ADNc.- ácido desoxiribonucleico codificador (cDNA, "codifying desoxiribonucleic acid").

APG.- ácido poligalacturónico (PGA, "polygalacturonic acid").

ARN.- ácido ribonucleico (DNA, "ribonucleic acid").

ARNm.- ácido ribonucleico mensajero (mDNA, messenger ribonucleic acid).

Asn.- "asparagine", asparagina (N).

DP.- "degree of polymerization", grado de polimerización.

EDTA.- ácido etiléndiamino tetraacético.

EGTA.- ácido etilénglicol tetraacético.

EndoPG.- "endopolygalacturonase", endopoligalacturonasa.

EndoPGTE.- endopoligalacturonato-trans-eliminasa.

EndoPMG.- endopolimetilgalacturonasa.

EndoPMTE.- endopectinmetil-trans-eliminasa.

ExoPG.- "exopolygalacturonase", exopoligalacturonasa.

ExoPGTE.- exopoligalacturonato-trans-eliminasa.

ExoPMG.- exopolimetilgalacturonasa.

ExoPMTE.- exopectinmetil-trans-eliminasa.

GDP.- "guanosin tiotriofsfate", guanosina tiotriofsfato.

Gly.- "glycine", glicina (G).

GTP.- "guanil tiofsfate", guanil tiofsfato.

GUS.- "β-glucuronidase", β-glucuronidasa.

HGA.- "homogalacturonan", homogalacturonano.

kDa.- kilodaltones.

Km.- constante de Michaelis.

LRG.- "leucine rich human glycoprotein", glicoproteína humana abundante en leucina.

LRR.- "leucine repeat rich proteins", proteínas abundantes en repeticiones de leucina.

μ M.- micromolar.

PCR.- "polymerase chain reaction", reacción de polimerasa en cadena.

PeI C.- "pectate liase", pectato liasa.

PG.- "polygalacturonase", poligalacturonasa.

PG1.- poligalacturonasa número 1.

PG2.- poligalacturonasa número 2.

PGIP.- "polygalacturonase inhibitor protein", proteína inhibidora de poligalacturonasa ó inhibidor glicoproteínico de poligalacturonasa.

PGIPs.- "polygalacturonase inhibitor proteins", proteínas inhibidoras de poligalacturonasa ó inhibidores glicoproteínicos de poligalacturonasa.

PGs.- "polygalacturonases", poligalacturonasas.

PL.- "endopectin lyase", endopectina liasa.

PME.- "pectin methyl esterase", pectinmetilesterasa.

PRI.- "porcine ribonuclease inhibitor", inhibidor porcino de ribonucleasa.

RGI.- "ramnogalacturonan", ramnogalacturonano.

Ser.- "serine", serina (S).

SLRPs.- "small leucine rich proteoglicans", proteoglicanos de cadena corta abundantes en leucina.

Thr.- "threonine", treonina (T).

UCD.- "University of California, Davis", Universidad de California, Davis.

*Con algunas excepciones, se han mantenido las abreviaturas usadas en el idioma inglés para evitar confusiones y agilizar la búsqueda de información en torno al tema.

Bibliografía

1. Abu-Goukh, A. A., Strand, L. L. y J. M. Labavitch. 1983a. Development-related changes in decay susceptibility and polygalacturonase inhibitor content of "Bartlett" pear fruit. *Physiological Plant Pathology* 23: 101-109.
2. Abu-Goukh, A. A., Greve, L.C. y J. M. Labavitch. 1983b. Purification and partial characterization of "Bartlett" pear fruit polygalacturonase inhibitors. *Physiological Plant Pathology* 23: 111-122.
3. Agblor, A., Henderson, H. M. y F. J. Madrid. 1994. Characterisation of alpha-amylase and polygalacturonase from *Lygus* spp. (Heteroptera:Miridae). *Food Research International* 27: 321-326.
4. Agrios, G. N. 1997. *Plant Pathology*. Academic Press. San Diego. 635 pp.
5. Albersheim, P., Neukom, H. y H. Deuel. 1960. Über die Bildung von ungesättigten Abbauprodukten durch ein pektinabbauendes Enzym. *Helv Chim Acta* 43: 1422-1426.
6. Albersheim, P. y A. J. Anderson. 1971. Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. *Proc Nat Acad Sci USA* 68(8): 1815-1819.
7. Anderson, A. J. y P. Albersheim. 1972. Host-pathogen interactions. V. Comparison of the abilities of proteins isolated from three varieties of *Phaseolus vulgaris* to inhibit the endopolygalacturonases secreted by three races of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Plant Pathology* 2: 339-346.
8. Apostol, I., Heinstein, P. F. y P. S. Low. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiol* 90: 109-116.
9. Bailey, J. A., O'Connell, R. J., Prung, R. J. y C. Nash. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In J. A. Bailey, M. J. Jeger (eds), *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. British Society for Plant Pathology, Inglaterra, p. 98-110.
10. Baldwin, E. A. y R. H. Biggs. 1988. Cell-wall lysing enzymes and products of cell-wall digestion elicit ethylene in citrus. *Physiologia Plantarum* 73: 58-64.
11. Barash, I. 1968. Liberation of polygalacturonase during spore germination by *Geotrichum candidum*. *Phytopathology* 58: 1364-1371.

12. Barmore, C. R. y T. K. Nguyen. 1985. Polygalacturonase inhibition in rind of Valencia orange infected with *Diplodia natalensis*. *Phytopathology* 75: 446-449.
13. Basham, H. G. y D. F. Bateman. 1975. Killing of plant cells by pectic enzymes: the lack of direct injurious interaction between pectic enzymes or their soluble reaction products and plant cells. *Phytopathology* 65: 141-153.
14. Bateman, D. F. y R. L. Millar. 1966. Pectic enzymes in tissue degradation. *Annu Rev Phytopathol* 4: 119-146.
15. Bateman, D. F., y H. G. Basham. 1976. Degradation of plant cell wall and membranes by microbial enzymes. In R. Heitefuss, P. H. Williams (eds), *Encyclopedia of Plant Physiology New Series Physiological Plant Pathology*. Vol. 4. Springer-Verlag, Berlin, p. 316-355.
16. Beck, M.J. 1975. Cell wall hydrolyses and protoplast death during the infection of onion *Allium cepa* var. Stuttgarten Reisen) by *Sclerotium cepivorum* Berk. Ph. D. Thesis. University of Hull.
17. Beckman, C H. 1969. The mechanism of gel formation by swelling of simulated plant cell wall membranes and perforation plates of banana root vessels. *Phytopathology* 59: 837-843.
18. Bellincampi, D. y G. Salvi. 1993. Oligogalacturonides inhibit the formation of roots on tobacco explants. *The Plant Journal* 4(1): 207-213.
19. Bird, C. R., Smith, C. J. S., Ray, J. A., Moureau, P., Bevan, M. W., Bird, A. S., Hughes, S., Morris, P. C., Grierson, D. y W. Schuch. 1988. The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 11: 651-662.
20. Bishop, P. D., Pearce, G., Bryant, J. E. y C. A. Ryan. 1984. Isolation and characterization of the proteinase inhibitor-inducing factor from tomato leaves. Identity and activity of poly- and oligogalacturonide fragments. *J Biol Chem* 259: 13172-13177.
21. Brennan, R. M., Gordon, S. y B. Williamson. 1999. The impact of breeding and genetics on berry fruit quality. M. Hagg, R. Ahvenainen y A. M. Evers (eds), *Agri-Food Quality II: quality management of fruits and vegetables - from field to table*, Finland, p. 353-356.
22. Broekaert, W. F. y W. J. Peumans. 1988. Pectic polysaccharides elicit chitinase accumulation in tobacco. *Physiol Plant* 74: 740-744.
23. Brown, S. M. y M. L. Crouch. 1990. Characterization of a gene family abundantly expressed in *Oenothera organensis* pollen that shows sequence similarity to polygalacturonase. *Plant Cell* 2: 263-274.

24. Brownleader, M. D., Jackson, P., Mobasheri, A., Pantelides, A.T., Sumar, S., Trevan, M. y P. M. Dey. 1999. Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 39(2): 149-164.
25. Buchanan, B. B., Gruisem, W. y J. L. Russel. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, EUA, p. 52-108.
26. Byrde, R. J. W., Fielding, A. H., Archer, S. A. y E. Davies. 1973. The role of extracellular enzymes in the rotting of fruit tissue by *Sclerotinia fructigena*. In R. J. W. Byrde, C. V. Cutting (eds), *Fungal pathogenicity and the plant's response*. Academic Press, London, p. 39-54.
27. Campbell, A. D. y J. M. Labavitch. 1991. Induction and regulation of ethylene biosynthesis and ripening by pectic oligomers in tomato pericarp discs. *Plant Physiol* 97: 706-713.
28. Caprari, C., Mattei, B., Basile, M. L., Salvi, G., Crescenzi, V., De Lorenzo, G. y F. Cervone. 1996. Mutagenesis of endopolygalacturonase from *Fusarium moniliforme*: Histidine residue 234 is critical for enzymatic and macerating activities and not for binding to polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP). *MPMI* 9(7): 617-624.
29. Cervone, F. y G. De Lorenzo. 1985. Pectic enzymes as phytotoxins: absorption of polygalacturonase from *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) to french bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protoplasts. *Phytopath Medit* 24: 322-324.
30. Cervone, F., De Lorenzo, G., Degra, L. y G. Salvi. 1986. Interaction of fungal polygalacturonase with plant proteins in relation to specificity and regulation of plant defense response. In B. Lugtenberg (ed), *NATO ASI Series. Recognition in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Interactions*. H4. Springer-Verlag, Berlin, p. 253-258.
31. Cervone, F., De Lorenzo, G., Degra, L. y G. Salvi. 1987a. Elicitation of necrosis in *Vigna unguiculata* Walp. by homogeneous *Aspergillus niger* endo-polygalacturonase and by α -D-galacturonate oligomers. *Plant Physiol* 85: 626-630.
32. Cervone, F., De Lorenzo, G., Degra, L., Salvi, G. y M. Bergami. 1987b. Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 85: 631-637.
33. Cervone, F., Hahn, M. G., De Lorenzo, G., Darvill, A. y P. Albersheim. 1989. Host-pathogen interactions. XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. *Plant Physiol* 90: 542-548.
34. Cervone, F., De Lorenzo, G., Pressey, R., Darvill, A. G. y P. Albersheim. 1990. Can *Phaseolus* PGIP inhibit pectic enzymes from microbes and plants? *Phytochemistry* 29: 447-449.

35. Cervone, F., De Lorenzo, G., Caprari, C., Clark, A. J., Desiderio, A., Devoto, A., Leckie, F., Nuss, L., Salvi, G. y P. Toubart. 1993. The interaction between fungal endopolygalacturonase and plant cell wall PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). *In* B. Fritig, M. Legrand (eds), *Mechanisms of Plant Defense Responses*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 64-67.
36. Cervone, F., Castoria, R., Leckie, F. y G. De Lorenzo. 1997. Perception of fungal elicitors and signal transduction. *In* P. Aducci (ed), *Signal Transduction in Plants*. Series: Molecular and Cell biology Updates. Verlag, Switzerland, p. 153-177.
37. Cervone, F., De Lorenzo, G., Aracri, B., Bellincampi, D., Capone, I., Caprari, C., Clark, A. J. y A. Devoto. 1998. Molecular analysis of the polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) gene family in *Phaseolus vulgaris* L. Molecular genetics of host-specific toxins in plant disease. *In* F. Leckie, B. Mattei, L. Nuss, G. Salvi, G. De Lorenzo, K. Kohmoto (eds), *Proceedings of the 3rd Tottori International Symposium Daisen, Tottori, Japan*. Tottori, Japan, p. 297-307.
38. Chrispeels, M. J. 1994. Plant genetic engineering: new genes in old crops. *In* *Plants, genes and agriculture*. Jones and Bartlett Publishers, Boston, 478 pp.
39. Collmer, A. y N. T. Keen. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann Rev Plant Physiol* 24: 383-409.
40. Cooke, R. D., Ferber, C. E. M. y L. Kanagasabapathy. 1976. Purification and characterisation of polygalacturonases from commercial *Aspergillus niger* preparation. *Biochimica et Biophysica Acta* 452(2): 440-451.
41. Cooper, R. M. 1984. The role of cell wall degrading enzymes in infection and damage. *In* R. K. S. Wood, G. J. Jellis (eds), *Plant diseases: infection, damage and loss*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 13-27.
42. Cooper, R. M., Rankin, B. y R. K. S. Wood. 1978. Cell wall degrading enzymes of vascular wilt fungi II. Properties and modes of action of polysaccharidase of *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological Plant Pathology* 13:101-134.
43. Crookes, P. R. y D. Grierson. 1983. Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. *Plant Physiol* 72: 1088-1093.
44. Cutillas-Iturralde, A., Zarra, I. y E. P. Lorences. 1993. Metabolism of cell wall polysaccharides from persimmon fruit. Pectin solubilization during fruit ripening occurs in apparent absence of polygalacturonase activity. *Physiologia Plantarum* 89: 369-375.
45. Darvill, A., Augur, C., Bergmann, C., Carlson, R. W., Cheong, J. J., Eberhard, S., Hahn, M., Ló, V. M., Marfa, V., Meyer, B., Mohnen, D., O'Neill, A., Spiro, M. D., Halbeek, H., York, W. S. y P. Albersheim. 1992. Oligosaccharins-oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. *Glycobiology* 2(3): 181-198.

46. Davis, K. R., Darvill, A. G. y P. Albersheim. 1986a. Host-pathogen interactions. XXXI. Several biotic and abiotic elicitors act synergistically in the induction of phytoalexin accumulation in soybean. *Plant Mol Biol* 6: 23-32.
47. Davis, K. R., Darvill, A. G., Albersheim, P. y A. Dell. 1986b. Host-pathogen interactions. XXX. Characterization of elicitors of phytoalexin accumulation in soybean released from soybean cell walls by endopolygalacturonic acid lyase. *Z Naturforsch* 41c: 39-48.
48. Davis, K. R., Darvill, A. G., Albersheim, P. y A. Dell. 1986c. Host-pathogen interactions. XXIX. Oligogalacturonides released from sodium polypectate by endopolygalacturonic acid lyase are elicitors of phytoalexins in soybean. *Plant Physiol* 80: 568-577.
49. Davis, K. R. y K. Hahlbrock. 1987. Induction of defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments. *Plant Physiol* 85: 1286-1290.
50. De Bary, A. 1886. Über einige Sclerotinien und Sclerotien Krankheiten. *Botanische Zeitung* 22: 377-392.
51. De Lorenzo, G., Ranucci, A., Bellincampi, D., Salvi, G. y F. Cervone. 1987. Elicitation of phenylalanine ammonia-lyase in *Daucus carota* by oligogalacturonides released from sodium polypectate by homogeneous polygalacturonase. *Plant Science* 51: 147-150.
52. De Lorenzo, G., Cervone F., Hahn, M. G., Darvill, A. y P. Albersheim. 1991. Bacterial endopectate lyase: evidence that plant cell wall pH prevents tissue maceration and increases the half-life of elicitor-active oligogalacturonides. *Physiol Mol Plant Pathol* 39: 335-344.
53. De Lorenzo, G., Cervone, F., Bellincampi, D., Caprari, C. y A. J. Clark. 1994. Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell-cell communication. *Biochem Soc Trans* 22: 394-397.
54. De Lorenzo, G. y F. Cervone. 1996. Polygalacturonase inhibiting proteins (PGIPs): their role in specificity and defense against pathogenic fungi. *In* G. Stacey, N. T. Keen (eds), *Plant-Microbe Interactions*. Vol 3. Chapman & Hall, New York, p. 76-87.
55. Degrá, L., Salvi, G., Mariotti, D., De Lorenzo, G. y F. Cervone. 1988. A polygalacturonase-inhibiting protein in alfalfa callus cultures. *J Plant Physiol* 133: 364-366.
56. DellaPenna, D. y A. B. Bennett. 1988. *In vitro* synthesis and processing of tomato fruit polygalacturonase. *Plant Physiol* 86: 1057-1063.
57. Demain, A. L. Y H. J. Phaff. 1957. Recent advances in the enzymatic hydrolysis of pectic substances. *Communs Wallerstein Labs* 20: 119-140.

58. Desiderio, A., Aracri, B., Leckie, F., Mattei, B., Salvi, G., Tigelaar, H., Van Roekel, J. S. C., Baulcombe, D. C., Melchers, L. S., De Lorenzo, G. y F. Cervone. 1997. Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) with different specificities are expressed in *Phaseolus vulgaris* L. *Mol Plant-Microbe Interact* 10: 852-860.
59. Deuel, H y E Stutz. 1958. Pectic substances and pectic enzymes. *Adv Enzymol* 20: 341-382.
60. Devoto, A., Clark, A. J., Nuss, L., Cervone, F. y G. De Lorenzo. 1997. Developmental and pathogen-induced accumulation of transcripts of polygalacturonase-inhibiting protein in *P. vulgaris* L. *Planta* 202: 284-292.
61. Devoto, A., Leckie, F., Lupotto, E., Cervone, F. y G. De Lorenzo. 1998. The promoter of a gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein of *Phaseolus vulgaris* L. is activated by wounding but not by elicitors or pathogen infection. *Planta* 205: 165-174.
62. Dickinson, C. H. 1982. Host-pathogen specificity: Plant pathology and plant pathogens. Blackwell Scientific Publications, Boston, 229 pp.
63. Dickinson, D. B. y J. P. McCollum. 1964. Cellulase in tomato fruits. *Nature* 203: 525-526.
64. Dingle, J., Reid, W. W. y G. L. Solomons. 1953. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. II* Application of the 'Cup-plate' Assay to the Estimation of Enzymes. *J Sci Food Agric* 4: 149-155.
65. Doostdar, H., McCollum, T. G. y R.T. Mayer. 1997. Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from the gut of West Indies sugarcane rootstalk borer weevil (*Diaprepes abbreviatus* L.) larvae. *In Comp Biochem Physiol, Part B, Biochem mol biol.* Elsevier Science Inc, New York. 118B (4): 861-867.
66. Dumville, J. C. y S. C. Fry. 2000. Uronic acid-containing oligosaccharins: Their biosynthesis, degradation and signalling roles in non-diseased plant tissues. *Plant Physiol Biochem* 38: 125-140.
67. Durrands, P. D. y R. M. Cooper. 1988. The role of pectinases in vascular wilt disease as determined by defined mutants of *Verticillium albo-atrum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32: 363-371.
68. Emerson, E. 1938. The genetics of self incompatibility in *Oenothera organensis*. *Genetics* 23:190-202.
69. Farmer, E. E., Pearce, G. y C. A. Ryan. 1989. *In vitro* phosphorylation of plant plasma membrane proteins in response to the proteinase inhibitor inducing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1539-1542.
70. Farmer, E. E., Moloshok, T. D., Saxton, M. J. y C. A. Ryan. 1991. Oligosaccharide signaling in plantas: Specificity of oligouronide-enhanced plasma membrane protein phosphorylation. *J Biol Chem* 266: 3140-3145.

71. Favaron, F., Alghisi, P. y P. Marciano. 1992. Characterization of two *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonases with different abilities to elicit glyceollin in soybean. *Plant Sci* 83: 7-13.
72. Fielding, A. H. 1981. Short Communication. Natural inhibitors of fungal polygalacturonases in infected fruit tissues. *Journal of General Microbiology* 123 (2): 337-381.
73. Fisher, M. L., Anderson, A. J. y P. Albersheim. 1973. Host-Pathogen Interactions. VI. A single plant protein efficiently inhibits endopolygalacturonases secreted by *Colletotrichum lindemuthianum* and *Aspergillus niger*. *Plant Physiol* 51: 489-491.
74. Fischer, R. L. y A. B. Bennett. 1991. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 675-703.
75. Frediani, M., Cremonini, R., Salvi, G., Caprari, C., Desiderio, A., D'Ovidio, R., Cervone F. y G. De Lorenzo. 1993. Cytological localization of the *pgip* genes in the embryo suspensor cells of *Phaseolus vulgaris* L. *Theor Appl Genet* 87: 369-373.
76. García-Maceira, F. I., Di Pietro, A. y M. I. G. Roncero. 2000. Cloning and disruption of *pgx4* encoding an in planta expressed exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum*. *MPMI* 13 (4): 359-365.
77. Giovannoni, J. J., Della Penna, D., Bennett, A. B. y R. L. Fischer. 1989. Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic rin (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *The Plant Cell* 1: 53-63.
78. Glinka, E. M., Gladkikh, T. A. y M. A. Protsenko. 1996. Polygalacturonase inhibitor protein from potato tissues. *Dokl Ros Akad Nauk* 349: 421-423.
79. Glinka, E. M. y M. A. Protsenko. 1998. Polygalacturonase inhibiting protein in plant cell walls. *Biochemistry-Moscow* 63(9): 1015-1020.
80. Graham, J., Gordon, S. C. y B. Williamson. 1996. Progress towards the use of transgenic plants as an aid to control soft fruit pests and diseases Series: Conference Proceedings. Proceedings of an international conference held at the Brighton Centre and The Brighton Metropole Hotel. British Crop Protection Council, Great Britain, Vol. 3, p. 777-782.
81. Grierson, D., Tucker, G. A., y N. G. Robertson. 1981. The molecular biology of ripening. *In* J. Triend, M. J. C. Rhodes (eds), *Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetables*. Academic Press, London, p. 147-158.
82. Hadfield, K. A. y A. B. Bennett. 1998. Polygalacturonases: Many genes in search of a function. *Plant Physiol* 117: 337-343.

83. Hahn, M. G. 1981. Fragments of plant and fungal cell wall polysaccharides elicit the accumulation of phytoalexins in plants. Ph.D. Thesis. University of Colorado, Boulder, CO.
84. Hahn, M. G., Darvill, A. G. y P. Albersheim. 1981. Host-pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol* 68: 1161-1169.
85. Hahn, M. G., Cheong, J., Alba, R., Enkerli, J. y F. Cote. 1993. Oligosaccharide elicitors: structures and recognition. In B. Fritig, M. Legrand (eds), *Mechanisms of Plant Defense Responses*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 99-116.
86. Hargreaves, J. A. y J. A. Bailey. 1978. Phytoalexin production by hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* in response to constitutive metabolites released by damaged bean cells. *Physiol Plant Pathol* 13: 89-100.
87. Hargreaves, J. A. y C. Selby. 1978. Phytoalexin formation in cell suspensions of *Phaseolus vulgaris* in response to an extract of bean hypocotyls. *Phytochemistry* 17: 1099-1102.
88. Heale, J. B. y D. P. Gupta. 1972. Mechanism of vascular wilting induced by *Verticillium albo-atrum*. *Transactions of British Mycological Society* 58: 19-28.
89. Herron, S. R., Benen, J. A. E., Scavetta, R. D., Visser, J. y F. Jurnak. 2000. Structure and function of pectic enzymes: Virulence factors of plant pathogens. *PNAS* 97(16): 8762-8769.
90. Hijwegen, T. 1963. Lignification, a possible mechanism of active resistance against pathogens. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 69: 314-317.
91. Hobson, G. E. 1964. Polygalacturonase in normal and abnormal tomato fruit. *Biochem J* 92: 324-332.
92. Hoffman, R. M. y J. G. Turner. 1982. Partial purification of proteins from pea leaflets that inhibit *Ascochyta pisi* endopolygalacturonase. *Physiological Plant Pathology* 20:173-187.
93. Hoffman, R. M. y J. G. Turner. 1984. Occurrence and specificity of an endopolygalacturonase inhibitor in *Pisum sativum*. *Plant Pathology* 24: 49-59.
94. Huang, Q. y C. Allen. 2000. Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57(2): 77-83.
95. Izzo, R. V. y A. D. Murdoch. 1996. Proteoglycans of the extracellular environment: Clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J* 10: 598-614.

96. Isshiki, A., Akimitsu, K., Ishii, H. y H. Yamamoto. 2000. Purification of polygalacturonases produced by the pear scab pathogens *Venturia nashicola* and *Venturia pirina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56(6): 263-271.
97. Jacinto, T., Farmer, E. E. y C. A. Ryan. 1993. Purification of potato leaf plasma membrane protein pp34, a protein phosphorylated in response to oligogalacturonide signals for defense and development. *Plant Physiol* 103: 1393-1397.
98. Jenkins, E. S., Paul, W., Coupe, S. A., Bell, S. J., Davies, E. C. y J. A. Roberts. 1996. Characterization of an mRNA encoding a polygalacturonase expressed during pod development in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J Exp Bot* 47: 111-115.
99. Jin, D. F., y C. A. West. 1984. Characteristics of galacturonic acid oligomers as elicitors of cambene synthetase activity in castor bean seedlings. *Plant Physiol* 74: 989-992.
100. Jones, D. A. y J. D. G. Jones. 1963. The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. *Advances in Botanical Research London* 24: 89-167.
101. Jones, T. M., Anderson, A. J. y P. Albersheim. 1972. Host-pathogen interactions. IV. Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological Plant Pathology* 2: 153-166.
102. Kobe, B. y J. Deisenhofer. 1993. Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature* 366: 751-756.
103. Kobe, B. y J. Deisenhofer. 1994. The leucine-rich repeat: A versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* 19: 415-421.
104. Kramer, M., Sanders, R. A., Sheehy, R. E., Melis, M., Kuehn, M. y W. R. Hiatt. 1990. Field evaluation of tomatoes with reduced polygalacturonase by antisense RNA. In A. B. Bennett, S. O'Neil, A. R. Liss (eds), *Horticultural Biotechnology*. Wiley-Liss, New York, p. 347-355.
105. Labavitch, J. M., Greve, L. C., Powell, A. L. T., Bennett, A. B. y K. R. Sharrock. 1998. Polygalacturonase inhibitor proteins- Do they contribute to fruit defence against fungal pathogens?. G. I. Johnson, E. Highley, D. C. Joyce (eds), *Disease resistance in fruit*. Aciar Proceedings. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. Vol 80, p. 139-145.
106. Lafitte, C., Barthe, J. P., Montillet, J. I. y A. Touzé. 1984. Glycoprotein inhibitors of *Colletotrichum lindemuthianum* endopolygalacturonase in near isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* resistant and susceptible to anthracnose. *Physiological Plant Pathology* 25: 39-53.
107. Lafitte, C., Barthe, J. P., Gansel, X., Dechamp-Guillaume, G., Faucher, C., Mazau, D. y M. T. Esquerré-Tugayé. 1993. Differential induction by endopolygalacturonase of β -1,3-glucanases in *Phaseolus vulgaris* isoline susceptible and resistant to *Colletotrichum lindemuthianum* race β . *MPMI* 6(5): 628-634.

108. Lazan, M. H., Selamat, K. y Zainon, M. A. 1995. Beta-galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell wall modification during papaya fruit ripening. *Physiologia Plantarum* 95: 106-112.
109. Le Cam, B., Massiot, P. y F. Rouxel. 1993. Production of cell-wall polysaccharide-degrading enzymes by *Micocentrospora acerina*, a post-harvest pathogen of carrot. B. Fritig, M. Legrand (eds), *Mechanisms of Plant Defense Responses*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 181 pp.
110. Leckie, F., Mattei, B., Capodicasa, C., Hemmings, A., Nuss, L., Aracri, B., De Lorenzo, G. y F. Cervone. 1999. The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed beta-strand/beta-turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability. *The EMBO Journal* 18: 2352-2363.
111. Lee, S. y C. A. West. 1981. Polygalacturonase from *Rhizopus stolonifer*, an elicitor of casbene synthetase activity in castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings. *Plant Physiol* 67: 633-639.
112. Legendre, L., Heinstejn, P. F. y P. S. Low. 1992. Evidence for participating of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *The Journal of Biological Chemistry* 267(28):20140-20147.
113. Legendre, L., Rueter, S., Heinstejn, P. F. y P. S. Low. 1993. Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. *Plant Physiol* 102: 233-240.
114. Liners, F., Letesson, J. J., Didembourg, C. y P. Van Cutsem. 1989. Monoclonal antibodies against pectin. Recognition of a conformation induced by calcium. *Plant Physiol* 91: 1419-1424.
115. Mankarios, A. T. y J. Friend. 1980. Polysaccharide-degrading enzymes of *Botrytis allii* and *Sclerotium cepivorum*. Enzyme production in culture and the effect of the enzymes on isolated onion cell walls. *Physiological Plant Pathology* 17: 93-104.
116. Marfa, V., Gollin, D. J., Eberhard, S., Mohnen, D., Darvill, A. y P. Albersheim. 1991. Oligogalacturonides are able to induce flowers to form on tobacco explants. *The Plant Journal* 1(2): 217-225.
117. Mathieu, Y., Kurkdijan, A., Xia, H., Guern, J., Kotler, A., Spiro, M., O'Neill, M., Albersheim, P. y A. Darvill. 1991. Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Journal* 1: 333-343.
118. Maunder, M. J., Holdsworth, M. J., Slater, A., Knapp, J. E., Bird, C. R., Schuch, W. y D. Grierson. 1987. Ethylene stimulates the accumulation of ripening-related mRNAs in tomatoes. *Plant Cell Envir* 10: 177-184.

119. McMillan, G. P. y M. C. M. Pérombelon. 1995. Purification and characterization of a high pI pectin methyl esterase isoenzyme and its inhibitor from tubers of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Katahdin. *Physiol Mol Plant Pathol* 46(5): 413-427.
120. Meakin, P. J. y J. A. Roberts. 1991. Anatomical and biochemical changes associated with the induction of oilseed rape (*Brassica napus*) pod dehiscence by *Dasineura brassicae* (Winn.). *Ann Bot* 67: 193-197.
121. Melotto, E., Greve, L. C. y J. M. Labavitch. 1994. Cell wall metabolism in ripening fruit: VII Biologically active pectin oligomers in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits. *Plant Physiol* 106: 575-581.
122. Messiaen, J. y P. Van Cutsem. 1993. Defense gene transcription in carrot cells treated with oligogalacturonides. *Plant Cell Physiol* 34(7): 1117-1123.
123. Messiaen, J., Read, N. D., Cutsem, P. V. y A. J. Trewavas. 1993. Cell wall oligogalacturonides increase cytosolic free calcium in carrot protoplasts. *Journal of Cell Science* 104: 365-371.
124. Messiaen, J. y P. Van Cutsem. 1994. Pectic signal transduction in carrot cells: Membrane, cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant Cell Physiol* 35: 677-689.
125. Mindrinos, M., Katagiri, F., Yu, G. L. y F. M. Ausubel. 1994. The *A. thaliana* disease resistance gene *RPS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* 78: 1089-1099.
126. Mussell, H. W. y L. L. Strand. 1977. Pectic enzymes: involvement in pathogenesis and possible relevance to tolerance and specificity. In B. Solheim, J. Raa (eds), *Transactions of British Mycological Society Oslo*. Universitetsforlaget, Oslo, p. 31-70.
127. Neukom, H. 1963. Über den Abbau von Pektinstoffen. *Schweiz Landw Forsch* 2: 112-121.
128. Nothnagel, E. A., Mc Neil, M., Albersheim, P. y A. Dell. 1983. Host-pathogen interactions. XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins. *Plant Physiol* 71: 916-926.
129. Peretto, R., Favaron F., Bettini, V., De Lorenzo, G., Marini, S., Alghisi, P., Cervone, F. y P. Bonfante. 1992. Expression and localization of polygalacturonase during the outgrowth of lateral roots in *Allium porrum* L. *Planta* 188: 164-172.
130. Pickersgill, R., Smith, D., Worboys, K. y J. Jenkins. 1998. Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *The Journal of Biological Chemistry* 38: 24660-24664.

131. Podila, G. K., Dickman, M. B., Rogers, L. M. y P. E. Kolattukudy. 1988. Transcriptional activation of a cutinase gene in isolated fungal nuclei by plant cutin monomers. *Science* 242: 922-925.
132. Powell, A. L.T., Stotz, H. U., Labavitch, J. M. y A. B. Bennett. 1994. Glycoprotein inhibitors of fungal polygalacturonases. *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions* 3: 399-402.
133. Powell, A. L. T., Van Kan, J., Ten Have, A., Visser, J., Greve, L. C., Bennett, A. B. y J. M. Labavitch. 2000. Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Mol Plant-Microbe Interact* 13(9):942-950.
134. Pressey, R. y J. K. Avants. 1977. Occurrence and properties of polygalacturonase in *Avena* and other plants. *Plant Physiol* 60: 548-553.
135. Pressey, R. y B. Reger. 1989. Polygalacturonase in pollen from corn and other grasses. *Plant Sci* 59: 57-62.
136. Rexová-Benková, L. y M. Mracková. 1978. Active groups of extracellular endo-D-galacturonanase of *Aspergillus niger* derived from pH effect on kinetic data. *Biochimica et Biophysica Acta* 523(1): 162-169.
137. Reymond, P., Grünberger, S., Paul, K., Müller, M. y E. E. Farmer. 1995. Oligogalacturonide defense signals in plants: large fragments interact with the plasma membrane *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(10): 4145-4149.
138. Robertsen, B. 1986. Elicitors of the production of lignin-like compounds in cucumber hypocotyls. *Physiological Plant Pathology* 28: 137-148.
139. Robertsen, B. 1987. Endo-polygalacturonase from *Cladosporium cucumerinum* elicits lignification in cucumber hypocotyls. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 31: 361-374.
140. Ryan, C. A. y E. E. Farmer. 1991. Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. *Annu Rev Plant Physiol Mol Bio* 42: 651-674.
141. Salvi, G., Giarrizzo, F., De Lorenzo, G. y F. Cervone. 1990. A polygalacturonase-inhibiting protein in the flowers of *Phaseolus vulgaris* L. *J Plant Physiol* 136: 513-518.
142. Scott-Craig, J. S., Panaccione, D. G., Cervone, F. y J. D. Walton. 1990. Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. *The Plant Cell* 2: 1191-1200.
143. Sexton, R. y J. A. Roberts. 1982. Cell biology of abscission. *Ann Rev Plant Physiol* 33: 133-162

144. Sharrock, K. R. y J. M. Labavitch. Polygalacturonase inhibitors of Bartlett pear fruits: differential effects on *Botrytis cinerea* polygalacturonase isozymes, and influence on products of fungal hydrolysis of pear cell walls and on fruit defense responses. *Physiol Mol Plant Pathol* (en prensa).
145. Sitrit, Y., Downie, B., Bennett, A. B. y K. J. Bradford. 1996. A novel exo-polygalacturonase is associated with radicle protrusion in tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds (abstract no. 752). *Plant Physiol* 111: S-161.
146. Sitton, D., y C. A. West. 1975. Casbene, an antifungal diterpene produced in cell-free extracts of *Ricinus communis* seedlings. *Phytochemistry* 14: 1921-1925.
147. Steinmayr, M., Motte, P., Sommer, H., Saedler, H. y Z. Schwarz-Sommer. 1994. *FIL2*, an extracellular leucine-rich repeat protein, is specifically expressed in *Antirrhinum* flowers. *The Plant Journal* 5(4): 459-467.
148. Stekoll, M. S., y C. A. West. 1978. Purification and properties of an elicitor of castor bean phytoalexin from culture filtrates of the fungus *Rhizopus stolonifer*. *Plant Physiol* 61: 38-45.
149. Stotz, H. U., Powell, A. L. T., Damon, S. E., Greve, L. C., Bennett, A. B. y J. M. Labavitch. 1993. Molecular characterization of a polygalacturonase inhibitor from *Pyrus communis* L. cv Bartlett. *Plant Physiol* 102: 133-138.
150. Stotz, H. U., Contos, J. J. A., Powell, A. L. T., Bennett, A. B. y J. M. Labavitch. 1994. Structure and expression of an inhibitor of fungal polygalacturonases from tomato. *Plant Molecular Biology* 25: 607-617.
151. Stotz, H. U., Bishop, J. G., Bergmann, C. W., Koch, M., Albersheim, P., Darvill, A. G. y J. M. Labavitch. 2000. Identification of target amino acids that affect interactions of fungal polygalacturonases and their plant inhibitors. *Physiol Mol Plant Pathol* 56(3):117-130.
152. Svalheim, O. y B. Robertsen. 1993. Elicitation of H₂O₂-production in cucumber hypocotyl segments by oligo-1,4- α -D-galacturonides and oligo- β -glucans. In B. Fritig, M. Legrand (eds), *Mechanisms of Plant Defense Responses*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 180.
153. Taylor, J. E., Tucker, G. A., Lasslett, Y., Smith, C. J. S., Arnold, C. M., Watson, C. F., Schuch, W., Grierson, D. y J. A. Roberts. 1990. Polygalacturonase expression during leaf abscission of normal and transgenic plants. *Planta* 183: 133-138.
154. Thain, J. F., Doherty, H. M., Bowles, D. J. y D. C. Wildon. 1990. Oligosaccharides that induce proteinase inhibitor activity in tomato plants cause depolarization of tomato leaf cells. *Plant Cell Environ* 13:569-574.
155. Thain, J. F., Gubb, I. R. y D. C. Wildon. 1995. Depolarization of tomato leaf cells by oligogalacturonide elicitors. *Plant Cell and Environment* 18: 211-214.

156. Toubart, P., Desiderio, A., Salvi, G., Cervone, F., Daroda, L. y G. De Lorenzo. 1992. Cloning and characterization of the gene encoding the endopolygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris* L. *The Plant Journal* 2(3): 367-373.
157. Tucker, G. A., Robertson, N. G. y D. Grierson. 1981. The conversion of tomato fruit PG isoenzyme 2 into isoenzyme 1 *in vitro*. *Eur J Biochem* 115: 87-90.
158. Tucker, G. A. y D. Grierson. 1982. Synthesis of polygalacturonase during tomato fruit ripening. *Planta* 115: 87-90.
159. Uritani, I. y M. A. Stahmann. 1961. Pectolytic enzymes of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology* 51: 277-285.
160. Van Der Cruyssen, G. y O. Kamoen. 1993. Regulation of polygalacturonases of *Botrytis cinerea*. In B. Fritig, M. Legrand (eds), *Mechanisms of Plant Defense Responses*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 8.
161. Vance, C. P., Kirk, T. M. y R. T. Sherwood. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 18: 259-288.
162. Verhoeff, K. y J. I. Liem. 1978. Presence of endo-polygalacturonase in conidia of *Botrytis cinerea* before and during infection. *Phytopath Z* 91: 110-115.
163. Voragen, A. G. J. 1972. Characterization of pectin lyases on pectins and methyl oligogalacturonates. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, 121pp.
164. Walker, J. C. 1993. Receptor-like protein kinase genes of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 3(3): 451-456.
165. Weurman, C. 1954. Pectinase in pear. *Acta Botanica Neerlandica* 3: 108-113.
166. Wing, R. A., Yamaguchi, J., Larabell, S. K., Ursin, V. M., y S. McCormick. 1990. Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *Plant Molecular Biology* 14: 17-28.
167. Zhou, L., Liu, Y., Li-Jian, W., Yang-Xue, H., Cao, Y., Li, Z., Yong, L., Li, J. W., Yang, X. H. y C. Yang. 1998. On the inhibition effect of PGIP in wheat to some fungi. *Acta Phytopathologica Sinica* 28(2): 107-112