



**Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo, A.C.**

**ANÁLISIS DE FRAGMENTOS DE  
RAMNOGALACTURONANO I COMO INDUCTORES DEL  
MECANISMO DE DEFENSA DEL TOMATE**

---

Por:

**María Isabel Jiménez Maldonado**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de María Isabel Jiménez Maldonado, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestría en ciencias.



---

Dra. Rosalba Troncoso Rojas  
Director de Tesis



---

Dr. Martín Ernesto Tiznado Hernández  
Asesor



---

Dr. Agustín Rascón Chú  
Asesor



---

Dra. Elizabeth Carvajal Millán  
Asesor



---

Dr. Jaime Lizardi Mendoza  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACYT por la oportunidad y el apoyo económico que me brindó para seguir con mis estudios de posgrado. Al CIAD Hermosillo por acogerme y abrirme las puertas de tan importante centro de investigación que se distingue por su calidad científica y programas de posgrado que permitieron expandir mi conocimiento y profesionalismo. Al laboratorio de Biotecnología de Vegetales y a la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV) que siempre me apoyaron, facilitándome los recursos para llevar a cabo la investigación del presente trabajo.

A mi comité de tesis conformado por la Dra. Rosalba Troncoso Rojas que fungió como mi directora y que siempre estuvo a mi lado en las buenas y en las malas, ayudándome, cuidándome e impulsándome, no sólo en la parte profesional sino también en lo personal, convirtiéndose así en una de las personas más importantes que han sido parte de mi vida. GRACIAS por todo Doctora Rosalba.

Al Doctor Martín Ernesto Tiznado Hernández por compartirme sus conocimientos y su amistad. Por ser una gran persona, porque siempre me apoyó incondicionalmente, interesándose siempre por mi bienestar y conocimiento. GRACIAS Doctor por ser único.

Al Doctor Agustín Rascón Chú por su apoyo y cariño. Por compartirme sus anécdotas y experiencias profesionales y de vida. Porque siempre me enseñó que en esta vida no se debe rendir tan fácilmente sin antes dar batalla. GRACIAS Doctor.

A la Dra. Elizabeth Carvajal Millán por compartir conmigo sus conocimientos en un tema que desconocía, apoyándome y enseñándome el camino correcto para

entender cada resultado. Además, por permitirme conocer a la gran persona que es, admirándola por su tenacidad y fuerza.

Al Doctor Jaime Lizardi Mendoza por su apoyo, disponibilidad, paciencia y amabilidad. Por impulsarme en aprender temas nuevos y por brindarme un poco de tanto conocimiento que posee. Gracias doctor por la experiencia.

A la Q.B. Karla G. Martínez Robinson y a la Q.B. Alma Consuelo Campa Mada, por su gran apoyo incondicional, su cariño y su paciencia. Por permitirme ser parte de su área de trabajo y tratarme con mucho cariño y amabilidad, gracias por ser grandes personas.

Al M.C. Alberto Sánchez Estrada y al M.C. Ángel Javier Ojeda Contreras porque siempre me apoyaron durante todo el camino de mi posgrado, además de siempre brindarme su amistad y cariño.

## DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada primeramente a mi familia, quienes siempre estuvieron a mi lado sin importar la distancia y mi ausencia en casa. A mi mamá Alejandrina, por creer en mí nuevamente, por apoyarme incondicionalmente, por procurarme y por estar siempre presente en mi corazón a pesar de la gran distancia que nos separa, TE AMO mami. A mi tía Dominga que es mi segunda madre y que siempre me ha apoyado a lo largo del camino de mi vida, porque sus consejos jamás me dejaron caer y porque su fuerza y cariño son mi motor para seguir adelante, la ADORO tía. A mi papá Marcelo por tanto apoyo, cariño y paciencia, porque siempre me impulsó a no tenerle miedo a la vida y que la distancia entre mi familia y yo, no era impedimento para salir adelante porque ellos siempre estarían conmigo, TE AMO papi. A mi hermanita Jacqueline que a pesar de la distancia siempre hemos estado unidas; gracias por hacerte cargo de mis obligaciones durante mi ausencia y por tener las palabras de apoyo y consuelo justo cuando las necesité, te ADORO hermanita. A mis hermanos Julio y José porque a pesar de no conocernos, siempre han cuidado de uno de mis más grandes tesoros. A mis otros hermanos, mis primos José Antonio, Juan y Aurora, porque me enseñaron uno de los valores más importantes, ser hermanos a pesar de todo y a enfrentar mis temores y caídas con fuerza, que se puede salir adelante paso a paso y que dios siempre nos pone en el tiempo y lugar precisos, los quiero mucho. A Chanel, Julio, Daniel y Don Paulo, por ser parte de mi familia y llevar ya varios años acompañándome y acompañando a mis grandes tesoros. A mi nena Eimy porque me impulsa y obliga a darle el buen ejemplo para que ella sea mejor persona cada día, te quiero mami. A mis abuelitos, que siempre fueron difíciles de comprender pero que gracias a ellos conocí lo que es el cariño de abuelos, porque a pesar de una de sus pérdidas los llevo en mi pensamiento y mi corazón; perdón por no estar con ustedes al final de sus vidas, los quiero y querré siempre abuelitos.

Por otra parte, este trabajo también se lo dedico a mi gran amor, amigo y compañero de vida, que ha estado conmigo durante ya varios años, Andrés gracias por tus enseñanzas, tu apoyo y amor. Porque compartimos una meta y un propósito más y porque sabemos que concluirlo fue muy difícil. Doy gracias a dios de tenerte a mi lado y si él y el destino nos permiten seguir juntos, espero que podamos continuar construyendo nuevas cosas y un mejor futuro, te quiero mucho.

A mis amigos que siempre han estado a mi lado, haciendo presencia en cada mensaje, llamada o visita; apoyándome moralmente y haciéndome sentir afortunada de tenerlos. Son la familia que yo elegí y mis hermanos de corazón, espero que la vida nos permita seguir estando juntos a pesar de la distancia y que al final del camino nos podamos reír de la vida y valorar las caídas de las cuales sé que nos seguiremos levantando. Gracias por estar a mi lado Liz, Eunice, Eloina, Luis Ángel y Charlie, los aprecio muchísimo. También a mis nuevos amigos que espero la amistad perdure años, gracias por sus consejos, su compañía, su paciencia, su cariño y todas las experiencias que compartimos durante la maestría, los admiro y he aprendido de ustedes muchas cosas pero sobre todo han hecho de mí una mejor persona, haciendo valorar lo que tengo, gracias Aby, Ariel, Ángeles, Ángel, Esmeralda, Lupita y Jesús G.

También se lo dedico a mis compañeros de laboratorio que hicieron muy agradable el ambiente laboral, conocí grandes personas que con sus actitudes generaron un buen equipo de trabajo. Gracias por su apoyo y sus ánimos, y por hacerme sentir muy acogida, a la Dra. Tania, a Laura, Alonso, Alma, Elías, Edith, Alí y Ana.

Y por último a mis compañeros de generación que me enseñaron tanto y doy gracias a dios porque fueron buenos compañeros, respetuosos y amables, gracias chicos.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
Lista de Figuras.....	x
Lista de Cuadros.....	xii
Resumen.....	xiii
Abstract.....	xv
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1. Calidad y Pérdidas Postcosecha del Tomate.....	3
2.2. Pared Celular y sus Componentes.....	4
2.3. Polisacáridos Pécticos y su Función en la Pared Celular Vegetal.....	8
2.3.1. Estructura y Función del Homogalacturonano (HG).....	9
2.3.2. Estructura y Función de los Ramnogalacturonanos I y II (RG I y RG II).....	10
2.4. Efecto Elicitor de Fragmentos Pécticos en el Mecanismo de Defensa de Plantas y Frutos.....	12
2.4.1. Relación del Efecto Elicitor de los Fragmentos Pécticos con el Grado de Esterificación y de Polimerización.....	15
2.5. Mecanismo de Defensa de Naturaleza Proteica en Plantas y Frutos.....	17
<b>III. HIPÓTESIS.....</b>	<b>21</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
4.1. Objetivo General.....	22
4.2. Objetivos Específicos.....	22
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
5.1. Etapa I. Obtención y Caracterización Parcial de Fragmentos de RG I.....	23
5.1.1. Obtención de Fracciones de RG I.....	23
5.1.2. Caracterización Parcial de RG I y sus Fragmentos.....	24
5.1.2.1. Determinación de las Bandas de Absorción Asociadas a Enlaces Químicos Mediante Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR).....	24
5.1.2.2. Determinación de la Distribución de Pesos Moleculares.....	24



## CONTENIDO (continuación)

	<b>Página</b>
5.1.2.3. Determinación de Viscosidad Intrínseca y Peso Molecular por Dispersión de Luz.....	24
5.1.2.4. Determinación del Perfil de Azúcares Neutros por Cromatografía de Gases.....	25
5.1.2.5. Determinación del Contenido de Ácido Galacturónico.....	27
5.2. Etapa II. Efecto Elicitor de Fragmentos de RG I en Tomate.....	27
5.2.1. Selección del Material Vegetal.....	27
5.2.2. Aplicación de Fragmentos de RG I.....	28
5.2.3. Determinación de la Concentración de Proteína.....	28
5.2.4. Obtención de Extracto Proteico y Determinación de la Actividad Enzimática de la $\beta$ -1,3-Glucanasa.....	28
5.2.5. Determinación de la Actividad Enzimática de la Quitinasa.....	30
5.2.6. Obtención de Extracto Proteico y Determinación de la Actividad Enzimática de la Peroxidasa.....	30
5.3. Diseño de Experimentos.....	31
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
6.1. Caracterización Parcial de RG I y sus Fragmentos.....	32
6.1.1. Análisis de las Bandas de Absorción Asociados a Enlaces Químicos Determinadas por Espectroscopía por Infrarrojo (FT-IR).....	33
6.1.2. Análisis de la Distribución de Pesos Moleculares.....	36
6.1.3. Determinación de la Viscosidad Intrínseca y Peso Molecular por Dispersión de Luz.....	37
6.1.4. Perfil de Azúcares Neutros y Contenido de Ácido Galacturónico.....	42
6.2. Efecto Elicitor de Fragmentos de RG I en Tomate.....	44
6.2.1. Efecto de los Fragmentos de RG I en la Actividad Enzimática de la $\beta$ -1,3-Glucanasa.....	44
6.2.2. Efecto de los Fragmentos de RG I en la Actividad Enzimática de la Quitinasa.....	48
6.2.3. Efecto de los Fragmentos de RG I en la Actividad Enzimática de la Peroxidasa.....	51
<b>VII. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
<b>VIII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>58</b>
<b>IX. REFERENCIAS.....</b>	<b>59</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Conformación de la pared celular vegetal.....	5
2	Modelo de distribución de los polisacáridos de la pared celular.....	6
3	Estructura del homogalacturonano de la pectina.....	9
4	Estructura del ramnogalacturonano I de la pectina.....	11
5	Estructura de oligogalacturónidos.....	14
6	Degradación enzimática del RG I de papa con la RG liasa.	32
7	Sitio de acción de la RG liasa y formación del doble enlace en el extremo terminal del AGal, entre el C-4 y C-5.....	33
8	Espectros FT-IR de RG I sin fraccionar (s/f) y fracciones obtenidas por degradación de la RG liasa durante 6, 12 y 24 horas de incubación.....	35
9	Perfil de distribución de pesos moleculares de RG I de papa sin fraccionar por SE-HPLC.....	36
10	Cromatogramas HPSEC de RG I de papa sin fraccionar (s/f) y fraccionado mediante degradación con la RG liasa durante 6, 12 y 24 horas.....	38
11	Actividad de $\beta$ -1,3-glucanasa en frutos de tomate aplicados con dos fragmentos de RG I de papa (F-1 y F-2) durante 48 h a 20 °C y 85% H.R.....	46
12	Modelo de la regulación de pectina-WAKs en respuesta al crecimiento y al estrés.....	47
13	Actividad de quitinasa en frutos de tomate tratados con dos fragmentos de RG I de papa (F-1 y F-2) durante 48 h a 20 °C y 85% H.R.....	50

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
14	Actividad de peroxidasa en frutos de tomate tratados con dos fragmentos de RG I de papa (F-1 y F-2) durante 48 h a 20 °C y 85% H.R.....	53
15	Modelo propuesto del efecto elicitor de los fragmentos de RG I en frutos de tomate.....	56

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Propiedades moleculares del RG I de papa y fracciones obtenidas por degradación enzimática de la RG liasa.....	41
2	Composición de azúcares neutros y contenido de ácido galacturónico del RG I s/f y sus fracciones (6, 12 y 24 h de degradación enzimática).....	43
3	Efecto de los fragmentos de RG I en la actividad específica de $\beta$ -1,3-glucanasa en frutos de tomate.....	45
4	Efecto de los fragmentos de RG I en la actividad específica de quitinasa en frutos de tomate.....	48
5	Actividad específica de la peroxidasa en tomates tratados con fragmentos de RG I.....	52

## Resumen

El ramnogalacturonano I (RG I) es parte de la pectina de la pared celular vegetal y se ha sugerido que cumple una función importante en la fisiología de la pared celular. Los cambios en ella son catalizados por enzimas como la RG liasa (RGL) dando lugar a la formación de diversos fragmentos. Actualmente, existe poca información sobre el efecto inductor de estos fragmentos en el mecanismo de defensa en frutos, y sobre sus características físico-químicas y estructurales. Por lo anterior, el objetivo fue caracterizar parcialmente el RG I de papa y sus fragmentos obtenidos por degradación enzimática de la RGL; así como determinar el efecto inductor de estos fragmentos en los niveles de actividad de enzimas de defensa en frutos de tomate. Se obtuvieron tres fragmentos mediante la degradación de RG I de papa con la enzima RGL. Se determinaron las bandas de absorción asociados a enlaces químicos mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), el peso molecular y viscosidad intrínseca por cromatografía de alta resolución de exclusión por tamaño acoplado a un detector de dispersión de luz, el perfil de azúcares neutros por cromatografía de gases y el ácido galacturónico por espectrofotometría (UV-visible). Se aplicaron dos fragmentos de RG I (F-1 y F-2) a frutos de tomate, se evaluó la actividad enzimática de quitinasa por fluorometría y de glucanasa y peroxidasa por espectrofotometría (UV-visible) a distintos tiempos: 0, 0.5, 1, 6, 24 y 48 horas. Se observaron cambios en los espectros de FT-IR obtenidos de los fragmentos con respecto al de RG I sin fragmentar. El peso molecular promedio del RG I sin fragmentar fue de 53 kDa y la viscosidad intrínseca de 41 mL/g; mientras que los fragmentos presentaron valores más bajos. El contenido de azúcares neutros aumentó y el de ácido galacturónico disminuyó con respecto al RG I sin fragmentar. En los frutos de tomate, los niveles de la actividad de las enzimas quitinasa y peroxidasa incrementaron a la media hora posterior a la aplicación del fragmento F-2, indicando la respuesta inmediata de estas dos enzimas. En cambio, la aplicación de los fragmentos F-1 y F-2 indujo un aumento en el nivel de

actividad de la  $\beta$ -1,3-glucanasa hasta las 6 horas después de la aplicación. Se concluye que los fragmentos de RG I son estructuralmente diferentes al RG I sin degradar enzimáticamente e indujeron el mecanismo de defensa natural del fruto de tomate.

**Palabras clave:** Fragmentos de ramnogalacturonano I, FT-IR, dispersión de luz, perfil de azúcares, inducción de actividad enzimática, frutos de tomate.

## Abstract

The rhamnogalacturonan I (RG I) is part of pectin plant cell wall and it has been suggested that plays an important in the physiology of the cell wall function. Changes therein are catalyzed by enzymes such as lyase RG (RGL) resulting in the formation of various fragments. Currently, there is few information on the inductor effect of these fragments in the fruit defense mechanism, and their physico-chemical and structural characteristics. Therefore, the objective was to partially characterize the RG I potato and fragments obtained by enzymatic degradation of RGL; and determine the inductor effect of these fragments in the levels of activity of defense enzymes in tomato fruits. Three fragments were obtained by degradation of RG I potato with RGL enzyme. Were determined absorption bands associated with chemical bonds by infrared spectroscopy Fourier transform (FT-IR), molecular weight and intrinsic viscosity by high performance chromatography exclusion size coupled to a detector light scattering, profile neutral sugar by gas chromatography and galacturonic acid by spectrophotometry (UV-visible). Two fragments of RG I (F-1 and F-2) were applied to tomato fruits, was evaluated the enzyme activity of chitinase by fluorometry and glucanase and peroxidase by spectrophotometrically (UV-visible) at different times: 0, 0.5, 1, 6, 24 and 48 hours. Changes were observed in the FTIR spectra fragments obtained with respect to RG I unfragmented. The average molecular weight RG I unfragmented was 53 kDa and the intrinsic viscosity of 41 mL/g; while fragments had lower values. The content of neutral sugars increased and decreased galacturonic acid with respect to RG I unfragmented. In tomato fruits, levels of activity of chitinase and peroxidase enzymes increased to half an hour after application of F-2 fragment, indicating the immediate response of these two enzymes. However, the application of the F-1 and F-2 induced an increase in the level of activity of the  $\beta$ -1, 3-glucanase to 6 hours after application. It is concluded that fragments of RG I are structurally different to RG I without degrading enzyme and induced the natural defense mechanism of tomato fruit.

**Index words:** Fragments of rhamnogalacturonan I, FT-IR, light scattering, sugar profile, induction of enzymatic activity, tomato fruits.



## I. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los frutos de mayor producción en el mundo; sin embargo, es altamente perecedero y fácilmente atacado por patógenos, de los cuales, los hongos son los principales agentes causantes del deterioro (Juárez-Becerra et al., 2010). Según la FAO, la agricultura mundial pierde aproximadamente el 12% de la producción cada año, por daños ocasionados por hongos fitopatógenos. Estos daños ocurren a pesar de la utilización de fungicidas, los cuales, superan anualmente los 20, 000 millones de dólares en el mercado global (Di Pietro y Roncero, 2004). Sin embargo, el uso discriminado de fungicidas ha provocado problemas de salud relacionados con la residualidad en alimentos y ha inducido al desarrollo de cepas resistentes de hongos fitopatógenos, que es uno de los problemas más importantes en la agricultura (Tripathi y Dubey, 2004).

Debido a lo anterior, la tendencia mundial actual demanda la reducción del uso de fungicidas sintéticos y por lo tanto, hay un creciente interés público y científico hacia la búsqueda de alternativas ecológicamente más seguras que aseguren la inocuidad de los alimentos. Una alternativa para reducir o inhibir el desarrollo de este tipo de deterioro, es la inducción del mecanismo de defensa natural, en la cual se activa la síntesis de metabolitos secundarios (fitoanticipinas y fitoalexinas) y se realizan modificaciones en las defensas estructurales (creación aleatoria de enlaces entre los polímeros de pared celular, lignificación, suberización). También aumenta la actividad de enzimas relacionadas con la patogénesis como quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa, además de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales juegan un papel importante en la defensa contra patógenos

(Beerhues y Kombrink, 1994; Hwang et al., 1997; Enríquez-Guevara et al., 2010). Dichos cambios pueden limitar la penetración y desarrollo de patógenos en los tejidos del hospedero, evitando o disminuyendo la enfermedad. Sin embargo, el sistema de defensa de la planta es mucho más complejo. La primera interacción entre planta-patógeno ocurre en la pared celular vegetal, la cual es una estructura macromolecular compleja que confiere forma y fuerza a la célula, y participa en la respuesta de diferentes tipos de estrés (Caffall y Mohnen, 2009; Sénéchal et al., 2014). La pared celular está integrada por tres componentes que son estructuralmente distintos: celulosa, hemicelulosa y pectina, ésta última es la más abundante y compleja (Caffall y Mohnen, 2009). Los polisacáridos de la pectina están compuestos principalmente de homogalacturonanos, ramnogalacturonanos (RG I y RG II) y xilogalacturonanos (Vincken et al., 2003). La estructura de estos polisacáridos proporciona las características que tiene la pectina en la pared celular vegetal, como el grado de porosidad, el nivel de hidratación, así como la adhesión celular, lo cual varía en respuesta al factor de estrés, además de que la pectina es el componente que participa de forma importante en la fisiología de la pared celular (Willats et al., 2001). Es claro que la pectina cumple una función importante en la pared celular incluyendo la respuesta de la planta al ataque de los patógenos.

Existen evidencias científicas que sugieren que los fragmentos de polisacáridos pécticos como los derivados de los oligogalacturonanos y los ramnogalacturonano I, pueden inducir el mecanismo de defensa en las plantas (Dinand et al., 1997; Boudart et al., 1998). Sin embargo, no se ha encontrado información científica publicada sobre el efecto de los fragmentos de RG I en la activación del mecanismo de defensa de en frutos de tomate. Debido a lo anterior, el objetivo de la presente tesis consistió en caracterizar parcialmente los fragmentos de ramnogalacturonano I y el efecto de su aplicación en el mecanismo de defensa natural del fruto de tomate.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Calidad y Pérdidas Postcosecha del Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*), es la hortaliza más demandada en todo el mundo y la de mayor valor económico (FAO, 2014). En México, es la principal hortaliza que se produce y exporta principalmente hacia los Estados Unidos (FAO, 2014). La calidad del tomate fresco es un aspecto importante en la comercialización, la cual está determinada por la industria agroalimentaria con características como: forma, color, tamaño, acidez, libre de daños visuales, pudriciones (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995; Urrestarazu G., 2004). La producción de tomate de mala calidad afecta la economía de la industria agroalimentaria, por lo que es importante realizar un manejo adecuado desde la cosecha hasta que llega al consumidor para conservar su excelente calidad.

La madurez del tomate al momento de ser cosechado es un componente integral de la calidad que determina su vida de anaquel y afecta la forma en que debe ser manipulado, transportado y comercializado (Alam et al., 2006). La maduración del fruto de tomate implica una serie de cambios genéticos, fisiológicos y bioquímicos, como la activación de genes específicos, la pérdida de clorofila, la síntesis de licopeno, la síntesis de compuestos asociados al sabor y aroma, la hidrólisis de pectinas y otros compuestos de la pared celular (Grierson y Kader, 1986; Martín-Hernández et al., 2012). Un cambio muy importante es el ablandamiento del fruto, atribuido principalmente a las modificaciones bioquímicas de los componentes de la pared celular (Grierson y Kader, 1986). Todos estos cambios que se presentan en los frutos los hacen más susceptibles a sufrir daños, lo que genera un ambiente más favorable para

el desarrollo de enfermedades, provocando pérdidas postcosecha considerables.

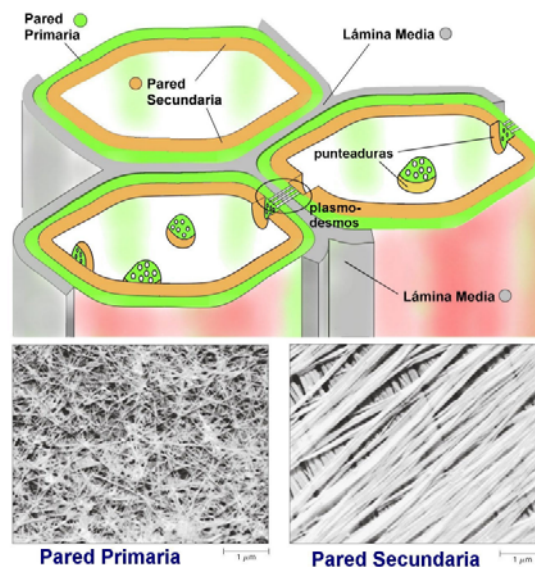
Las pérdidas postcosecha están relacionadas en gran parte con enfermedades causadas por patógenos, las cuales deben ser consideradas como elementos indispensables para la selección adecuada de prácticas o métodos de manejo (García-Brugger et al., 2006). El principal método para controlar el deterioro causado por estos patógenos, se basa en los fungicidas sintéticos. Sin embargo, ninguno de ellos es completamente efectivo y su uso indiscriminado ha provocado problemas de salud relacionados con la residualidad en alimentos, y ha inducido el desarrollo de cepas resistentes de hongos fitopatógenos, que es uno de los problemas más importantes en la agricultura (Tripathi y Dubey, 2004).

Con el fin de disminuir las pérdidas provocadas por patógenos, hay un creciente interés público y científico hacia la búsqueda de alternativas ecológicamente más seguras que garanticen la inocuidad de los alimentos. Una alternativa para disminuir o inhibir el desarrollo de patógenos, es la utilización de moléculas o compuestos químicos conocidos como elicitores cuya finalidad es activar los mecanismos de defensa que puedan proteger a los frutos del ataque por patógenos. Entre los elicitores se encuentran fragmentos de pared celular, como glucanos, oligogalacturonanos, xilano, entre otros (Hurlbert y Preston, 2001). Por lo tanto, sustituir el uso de fungicidas sintéticos por elicitores que promuevan el mecanismo de defensa natural de los frutos, puede ser una buena opción para conservar su calidad y reducir las pérdidas postcosecha.

## 2.2. Pared Celular y sus Componentes

Las células vegetales están rodeadas por una pared celular que consiste en una estructura compleja de polisacáridos, proteínas y compuestos alifáticos

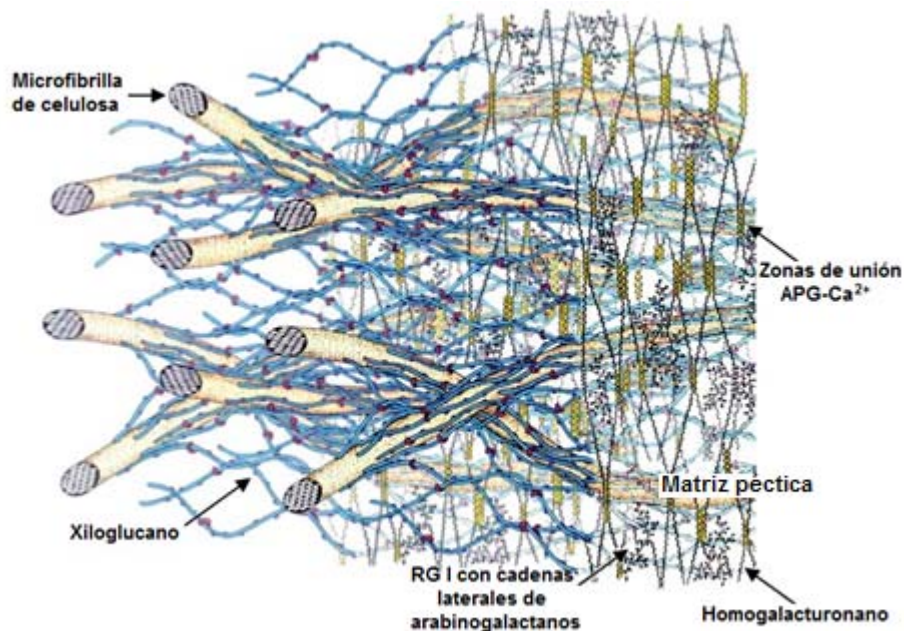
aromáticos, cuya composición varía dependiendo del estado de desarrollo del fruto (Vorwerk et al., 2004). La pared celular es el contacto con otras células y define la forma de cada célula vegetal adaptándose a la etapa de vida en la que se encuentre la planta o el fruto (Lodish, 2005; Almeida y Carpita, 2006). Durante el crecimiento inicial y la expansión celular se establece la lámina media y la pared primaria y posteriormente se puede desarrollar o no una pared secundaria (**Figura 1**) (Persson et al., 2007). Estas tres disposiciones de la pared celular de la planta se componen principalmente de heteropolisacáridos dinámicos, organizados en redes macromoleculares agrupados en tres clases: celulosa, hemicelulosa y pectina (Fry, 2004; Albersheim et al., 2010).



**Figura 1.** Conformación de la pared celular vegetal. Pared primaria y secundaria compuestas por microfibrillas de celulosa.

La celulosa consiste de cadenas lineales de unidades de glucosa unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos y es el componente principal de las paredes celulares de la mayoría de las plantas y la red de soporte más importante en la pared primaria y secundaria (Pogorelko et al., 2013). La hemicelulosa incluye arabinoxilanos, diferentes mananos,  $\beta$ -(1-3, 1-4)-glucanos

y xiloglucanos (componente principal); ésta se entrecruza con las fibras de celulosa adyacentes, lo que la hace fundamental en la arquitectura de la pared celular (Scheller y Ulvskov, 2010). Las pectinas son polisacáridos de ácido galacturónico unidos por enlaces  $\alpha$ -1,4, que constituyen básicamente a los homogalacturonanos e incluyen ramificaciones con xilogalacturonanos, arabinogalactanos y ramnogalacturonanos I y II (Fry, 2004; Vorwerk et al., 2004). Las pectinas le confieren plasticidad y fuerza a la pared celular y se encuentran estructuralmente unidas con iones  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que permite el entrecruzamiento de sus cadenas y favorece la integridad celular (**Figura 2**) (Willats et al., 2001). También controlan las características como pH y concentración de iones afectando la actividad de las enzimas catalíticas que se encuentran en la pared celular.



**Figura 2.** Modelo de distribución de los polisacáridos de la pared celular. Las microfibrillas de celulosa están unidas a xiloglucanos formando un entramado inmerso en pectina. Fuente: Carpita y Gibeaut (1993).

Durante la división celular, el control de la expansión se debe a la presión de turgencia que depende de los cambios en la extensibilidad de la pared celular primaria (Sénéchal et al., 2014). En plantas dicotiledóneas como la *Arabidopsis thaliana*, la pared celular primaria contiene puentes de hidrógeno que unen una red de microfibrillas de celulosa y xiloglucanos, embebidas en un complejo péctico y una matriz proteica (Carpita y Gibeaut, 1993). El crecimiento celular requiere del desplazamiento entre la celulosa y los xiloglucanos, lo cual es permitido por la presencia de proteínas específicas, tales como las expansinas (Cosgrove, 2005). La composición de la pared define su conformación espacial que va a depender de la etapa de desarrollo en la que se encuentre la célula.

La pared celular primaria, además del papel estructural que le proporciona a la célula, participa en la transmisión de información del medio extracelular, por lo que participa en procesos de señalización (Fry, 2004; Hématy et al., 2009). Durante la transducción de señales, permite a las plantas detectar y responder a los diversos cambios y condiciones del medio ambiente (Somerville et al., 2004; Underwood, 2012). La pared primaria contribuye a la integridad estructural de la pared y a la adhesión celular (Brown, 2004; Caffall y Mohnen, 2009). Existen evidencias de que los oligosacáridos provenientes de los polímeros de pared celular participan en la inmunidad de las plantas (Delaunoy et al., 2014); una de estas funciones pueden ser las señales transmitidas por algún polisacárido situado en la pared celular.

Es claro que el establecimiento de la pared celular depende mucho de la etapa de desarrollo en que se encuentre la célula y que esto le va atribuir sus funciones estructurales y de señalización. Pero también la composición de las paredes celulares puede ser diferente dependiendo del tipo de fruto, de la variedad y del estado de madurez en que se encuentre. Por ejemplo, se han reportado cambios en la composición de azúcares, pectinas y hemicelulosa en diferentes variedades de mango (Yashoda et al., 2006; Cárdenas-Coronel et al., 2012).

### 2.3. Polisacáridos Pécnicos y su Función en la Pared Celular Vegetal

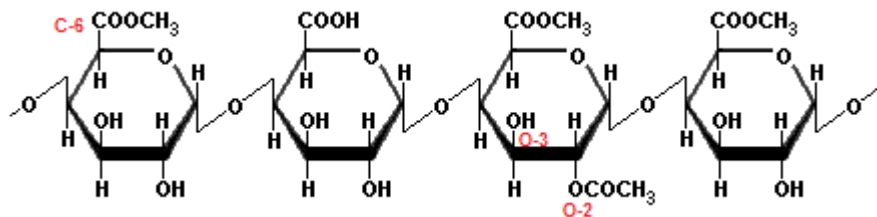
Las pectinas están localizadas en la pared celular de los tejidos de los frutos y debido a esto se encuentran disponibles para ser degradadas por una diversidad de enzimas hidrolíticas liberadas por algunos hongos fitopatógenos (Pagel y Heitefuss, 1990). Como ya se mencionó, las pectinas son polisacáridos complejos ricos en ácido galacturónico (AGal), contienen homogalacturonanos (HGs), ramnogalacturonanos I (RGs I), ramnogalacturonanos II (RGs II) y xilogalacturonanos (XGAs) (Mohnen, 2008; Burton et al., 2010). Los polisacáridos pécnicos con AGal son abundantes en las paredes celulares de las plantas y comprenden hasta un 30% de las dicotiledóneas, gimnospermas y monocotiledóneas (Ridley et al., 2001; O'Neill y York, 2003). Las paredes de gramíneas contienen menos pectina, aproximadamente 10% en peso seco (Carpita, 1996). Se ha sugerido, que el 90% de los ácidos urónicos en la pared, se derivan de los residuos de AGal de polisacáridos pécnicos (Selvendran, 1987). Por ejemplo, las paredes del tomate y del mango, contienen hasta un 35% y 52% de ácido urónico, respectivamente (Seymour et al., 1990).

La metil-esterificación/desesterificación de los polisacáridos pécnicos de la pared controla el crecimiento celular, la maduración del fruto y protege a las plantas del estrés biótico (Lionetti et al., 2012). Se sabe que los grupos metilo, acetilo y feruloil, además de modificar los polisacáridos de la pared celular, los protegen de la acción de glicosil hidrolasas específicas y cruzan enlaces que constituyen a la pared celular controlando la extensibilidad (Gou et al., 2012). La modificación de los polisacáridos de la pared celular vegetal puede alterar las funciones fisiológicas, por lo que la planta debe mantener la integridad funcional de la pared durante la morfogénesis y la exposición a señales ambientales (Hamann, 2012). La pared celular participa en la transducción de señales que les permite a las plantas, detectar y responder a los cambios ambientales; por lo tanto, son muy sensibles y receptivas a los cambios en sus paredes celulares (Underwood, 2012).



### 2.3.1. Estructura y Función del Homogalacturonano (HG)

El HG es un polímero presente en la pectina, como residuos de ácido D-galacturónico (AGal) con enlaces  $\alpha$ -1,4 que pueden representar hasta el 60% de las pectinas en la pared celular vegetal (Bush et al., 2001). Los residuos de AGal pueden ser metil-esterificados en el carboxilo del C-6 o acetilados en el O-2 u O-3 como se observa en la **Figura 3** (Ridley et al., 2001). El C-6 no metilado del residuo de AGal del HG tiene una carga negativa que puede interactuar con  $\text{Ca}^{2+}$  en pH neutro y si más de 10 residuos consecutivos de AGal desmetil-esterificados son coordinados, pueden formar un gel estable con otras moléculas pécticas (Liners et al., 1989). El complejo formado de HG- $\text{Ca}^{2+}$  provoca cambios conformacionales en las cadenas del polímero, formando estructuras biológicamente activas denominadas “cajas de huevo” (Cabrera et al., 2008).



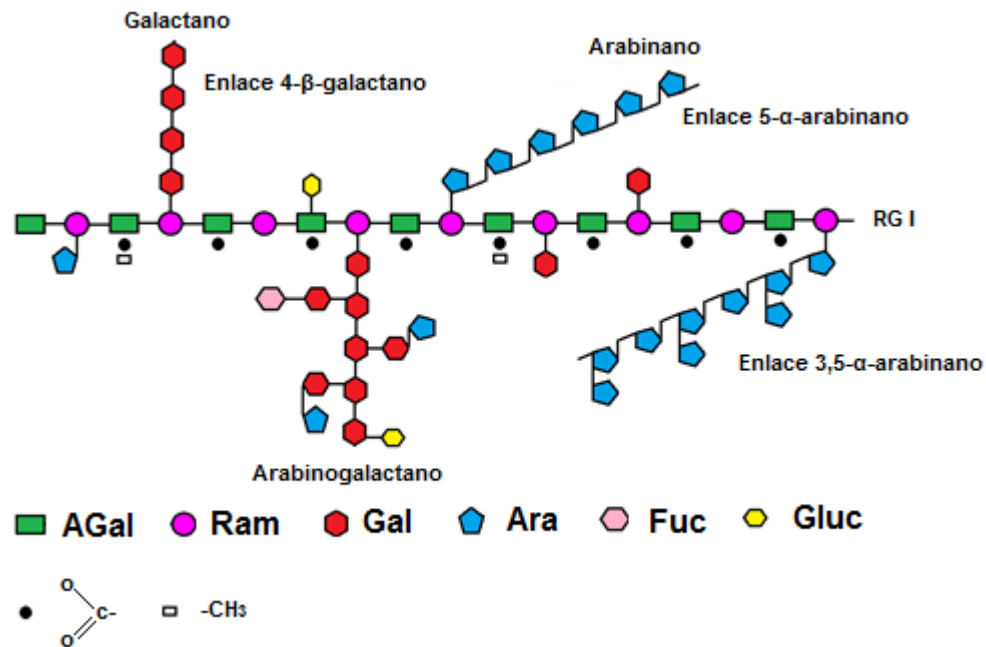
**Figura 3.** Estructura del homogalacturonano de la pectina. Constituida de ácido D-galacturónico con enlaces  $\alpha$ -1,4, acetilado en el O-2.

El esqueleto del HG está covalentemente unido a RG I, RG II y xilogalacturonano (XGA), que interactúan con polisacáridos de la hemicelulosa lo que sugiere una importante participación en la estabilización de la lámina media y el control de la porosidad y propiedades mecánicas de la pared celular (Popper y Fry, 2008). Se ha demostrado que la enzima endopoligalacturonasa (EPG) actúa en los residuos de AGal del HG e hidroliza entre el tercer y cuarto residuo; por lo tanto, necesita al menos cuatro residuos de AGal adyacentes

(Yapo et al., 2007). Debido a esto, es posible encontrar un residuo de AGal del HG unido a un RG I a través de un enlace  $\alpha$ -1,2 (Wu y Mort, 2014).

### 2.3.2. Estructura y Función de los Ramnogalacturonanos I y II (RG I y RG II)

El ramnogalacturonano I (RG I) está constituido por unidades repetidas de un disacárido compuesto de ácido galacturónico y ramnosa alternados, formando una estructura lineal y continua:  $[\rightarrow\alpha\text{-D-AGal-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-Ram-(1}\rightarrow\text{4)}\rightarrow]_n$  (Wu y Mort, 2014). Cantidades significativas de RG I se encontraron en la pared primaria y lámina media de papa (*Solanum tuberosum*) (Bush et al., 2001). El RGI aislado de la pared primaria está ramificado aproximadamente en la mitad de los residuos de la ramnosa en el C-4 con cadenas laterales neutras de residuos de arabinanos, galactanos o arabinogalactanos, como se observa en la **Figura 4** (Lau et al., 1985). Las cadenas laterales de galactano (con galactosas neutras) y arabinano (con arabinosas neutras) del RG I de las paredes de manzana, remolacha azucarera, soya, caqui y papa, mostraron heterogeneidad en su estructura (Sakamoto y Sakai, 1995; Huisman et al., 2001; Nakamura et al., 2002; Duan et al., 2003).



**Figura 4.** Estructura del ramnogalacturonano I de la pectina. La columna vertebral del polisacárido está constituida por una secuencia alternada de ácido galacturónico y ramnosa. La ramnosa a su vez está unida a cadenas de arabinanos, y/o galactanos y/o arabinogalactanos.

Los residuos de galactosa se encuentran en polisacáridos de la pared como los arabinogalactanos (AGs), xiloglucanos (XiGs) y ramnogalacturonanos I (RG I), pero es solamente en el RG I donde se encuentran como (1, 4)-β-D-galactano, así como en los arabinogalactanos (Almeida y Carpita, 2006). Se ha demostrado que el arreglo de RG I asociado a cadenas laterales de (1, 4)-β-D-galactano y (1, 5)-α-L-arabinano, se asocia a diferentes eventos de desarrollo de la célula en los frutos (Willats et al., 1999). Por ejemplo, en frutos de tomate el galactano aparece durante las primeras etapas de desarrollo y en las paredes celulares del pericarpio (Pérez-Almeida y Carpita, 2006). Sin embargo, las funciones de estos polímeros dentro de los RG I todavía no se conocen bien.

El ramnogalacturonano II (RG II), es muy complejo y está estructurado de una columna vertebral de HG de aproximadamente siete a nueve residuos de largo

con cuatro cadenas laterales bien definidas (Caffall y Mohnen, 2009). A pesar de su complejidad, la conservación de la estructura de RGII en las plantas sugiere que debe desempeñar un papel importante en la función de la pared celular (O'Neill et al., 2004). Las moléculas de RG II están asociadas entre sí, formando dímeros a través de enlaces diéster de boro; éste elemento es esencial para el crecimiento vegetal y la arquitectura de la pared (Acuña y Molina, 2007). En pectina de paredes celulares de hojas de calabaza (*Cucurbita pepo*) y de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cultivadas en suspensión, se encontró que contienen arriba del 60% de boro del contenido total en el RG II (Hu y Brown, 1994).

De acuerdo a lo anterior, se concluye que el contenido de polisacáridos pécticos en plantas y frutos varía dependiendo de la especie y del estado de maduración o desarrollo en que se encuentren, lo que los hace heterogéneos entre ellos. Por ejemplo, las cadenas laterales del RG I pueden tener galactanos, arabinanos o arabinogalactanos, lo que puede influir en la capacidad para transmitir señales y en su fisiología. La modificación de la interacción entre los polisacáridos pécticos y la hemicelulosa y celulosa de la pared celular, pudieran generar una respuesta por estrés, debido a que existen enzimas específicas encargadas de actuar cuando se dan estos cambios.

#### 2.4. Efecto Elicitor de Fragmentos Pécticos en el Mecanismo de Defensa de Plantas y Frutos

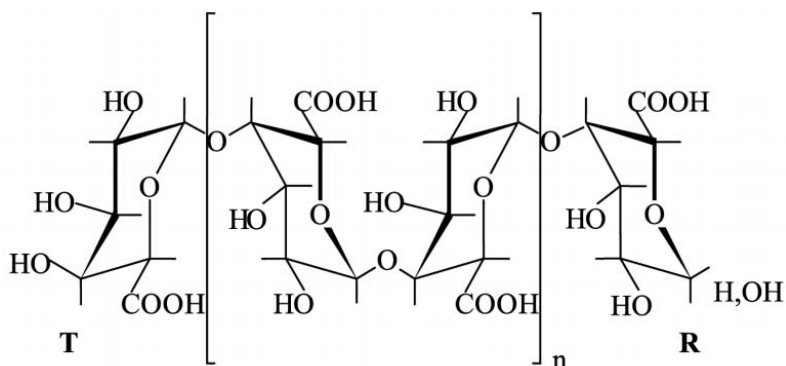
La resistencia a enfermedades de los frutos y hortalizas, por lo general disminuye durante la postcosecha, lo que los hace más susceptibles al ataque por patógenos (Wang et al., 2011). El reconocimiento planta-patógeno es un proceso donde el microorganismo interactúa con los receptores de la superficie celular vegetal; estos receptores son moléculas que interactúan en el intercambio de señales entre diversas moléculas (Hématy et al., 2009). Aquellas moléculas que estimulan cualquier respuesta de defensa en plantas, son

llamadas elicitores (Dixon y Lamb, 1990). La transducción de señales se genera en parte mediante oligosacáridos provenientes de la pared celular durante la invasión por patógenos causada por los cambios en su estructura (Haswell et al., 2008).

Se pueden inducir reacciones de defensa en plantas o frutos antes del ataque por patógenos, por las modificaciones específicas en la pared celular vegetal provocada por elicitores, lo cual reduce la penetración y crecimiento del microorganismo (Underwood, 2012). También estos cambios en la composición de la pared pueden inducir respuestas al estrés; por ejemplo, la supresión de la síntesis de celulosa produce la activación de genes relacionados con el estrés (Hamann et al., 2009; Hamann, 2012). Se ha demostrado en tabaco (*Nicotiana tabacum*) y *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), que la expresión de la poligalacturonasa (PG) fúngica y la consecuente reducción de homogalacturonanos (HG) en la pared celular, incrementa la resistencia a patógenos (Ferrari et al., 2007).

Los primeros fragmentos de pectina utilizados para inducir la respuesta de defensa, se utilizaron en el ensayo de la acumulación de fitoalexinas en cotiledones de soya (Hahn et al., 1981; Nothnagel et al., 1983). Estos fragmentos que actúan como elicitores endógenos, son oligogalacturónidos (OGs) con enlaces  $\alpha$ -1,4 de residuos de galacturonosil (**Figura 5**) que se pueden obtener por hidrólisis parcial de ácido poligalacturónico presente en la pectina (Nothnagel et al., 1983). La degradación de HGs se produce por la PG durante la infección por microorganismos y esto puede provocar la acumulación de OGs de defensa y a su vez inducir la síntesis de fitoalexinas y especies reactivas de oxígeno (Hahn et al., 1981; Ferrari et al., 2013). Por ejemplo, la digestión de HGs por una PG derivada de hongo o tomate, libera OGs como elicitores de un inhibidor de proteinasa inducida por una lesión (Ferrari et al., 2013). También los OGs indujeron la lignificación en hipocotilos de pepino, la expresión de genes de defensa en *Arabidopsis* y la producción de especies

reactivas de oxígeno en varias especies de plantas (Robertsen, 1986; Denoux et al., 2008; Galletti et al., 2008).



**Figura 5.** Estructura de oligogalacturónidos. **T:** extremo terminal, **R:** extremo reductor. Grado de polimerización=  $2n+2$ .

Boudart et al. (1998), reportaron una mayor actividad elicitora en los fragmentos de OGs de plantas de frijol resistentes a *Colletotrichum lindemuthianum*, lo cual correlacionaron con un mayor contenido de galactosa (Gal) y arabinosa (Ara), indicando la presencia de cadenas laterales de RGI. La actividad de estos OGs estaba directamente relacionada con un GE alto lo que posiblemente indica que hay más regiones que contienen AGal como dominios activos. En el caso del RG I, éste es degradado por la ramnogalacturonano liasa que cataliza el rompimiento de la cadena principal en los enlaces  $\alpha$ -1,4 entre la L-ramnosa y el ácido D-galacturónico (Mckie et al., 2001; McDonough et al., 2004). Dinand et al. (1997) obtuvieron dos tetrasacáridos ramnogalacturónidos ácidos de lino (*Linum usitatissimum* L.), los cuales mostraron una estructura primaria común:  $\alpha$ -D-AGal (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Ram (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-AGal-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Ram. Estos dos tetrasacáridos se diferenciaban por tener un grupo acetilo en la posición O-3 del residuo interno del AGal. La aplicación de esos tetrasacáridos indujeron la actividad de D-glucohidrolasas ( $\beta$ -D-xilosidasa,  $\alpha$ -1,4-D-galacturonasa, laminarinasa y quitinasa) en zarzamora (*Rubus fruticosus*). Estos autores

sugirieron que los ramnogalacturonanos, debido a su estructura, pueden actuar como moléculas de señalización de defensa en las plantas y frutos.

De acuerdo a lo anterior, se puede concluir que es claro que los fragmentos pécticos utilizados como elicitores provocan una respuesta de defensa en plantas y frutos, en los cuales la estructura de estos polisacáridos cumple una función importante. También cabe señalar que existe poca información acerca de fragmentos de ramnogalacturonano I que hayan sido utilizados como elicitores en frutos, por lo que resulta interesante analizar su comportamiento en frutos como el tomate.

#### **2.4.1. Relación del Efecto Elicitor de los Fragmentos Pécticos con el Grado de Esterificación y de Polimerización**

La metilesterificación o grado de esterificación juega un papel importante en la defensa de la planta. En *Arabidopsis* y trigo (*Triticum aestivum*), la alta metilesterificación disminuyó la susceptibilidad de las plantas a hongos necrótrofos y bacterias (Raiola et al., 2011; Volpi et al., 2011). Por otra parte, la resistencia de la planta silvestre de papa a la bacteria *Erwinia carotovora* se asocia a un alto grado de esterificación de la pectina (McMillan et al., 1993; Marty et al., 1997). Una alta metilesterificación de la pectina se relaciona estructuralmente al entrecruzamiento de borato-RG II y la regulación de la rigidez de la pared celular (Ishii y Matsunaga, 2001). Sin embargo, la desmetilesterificación provoca que los HGs sean más susceptibles a la degradación por enzimas fúngicas, tales como la poligalacturonasa (PG) o la pectato liasa (Limberg et al., 2000). La desmetilesterificación es necesaria para que las bacterias u hongos colonicen a los frutos o plantas, por lo que ellos mismos pueden inducirla (Raiola et al., 2011).

Los HGs pueden ser modificados por pectinmetilesterasas (PME), las cuales son reguladas por inhibidores endógenos que controlan el grado de

metilesterificación de los HGs (Pelloux et al., 2007). Por un lado, la actividad de la PME puede dar lugar a bloques de grupos carboxilo libres que interactúan con iones  $\text{Ca}^{2+}$ , confiriéndole una estructura similar a un gel y reforzando la pared celular (Micheli, 2001). Sin embargo, la actividad de la PME al azar promueve la acción de endopoligalacturonasas (EPG), reduciendo la firmeza y aumentando la porosidad de la pared así como la producción de OG's que promueven las defensas (Ehwald et al., 1992). Estudios previos reportan que en plantas de tomate transformadas se disminuyó la actividad de la PG, favoreciendo el ablandamiento y maduración del fruto, pero también se observó una mayor resistencia frente a patógenos necrótrofos que atacan a tomate (Osorio et al., 2011). Asimismo, la sobreexpresión de una PME específica en plantas de fresa silvestre (*Fragaria spp.*), aumentó la resistencia contra *Botrytis cinerea* (Osorio et al., 2008).

Por otro lado, la actividad biológica de los oligosacáridos es altamente dependiente de su grado de polimerización (DP). Por ejemplo Côté y Hahn (1994) reportan que OGs con un grado de polimerización de 1 a 20 son elicitores eficientes. Evidencias experimentales señalan que un grado de polimerización de 10-16, es la medida óptima para inducir las defensas y que en OGs más cortos (2-6) dependen de la actividad de los sistemas de patogénesis del fruto u hortaliza (Vorhölter et al., 2012). En tomate y papa, la aplicación de elicitores con ese grado de polimerización inducen reacciones de defensa (Weber et al., 1996; Simpson et al., 1998).

Fu et al. (2011) reportaron que en células de tabaco, los  $\beta$ -1,3-glucanos con bajo grado de polimerización (2-10) inducen respuestas de defensa más rápidas que la laminarina con alto grado de polimerización (25-40). Sin embargo los mismos autores reportaron que  $\beta$ -1,3-glucanos con alto grado de polimerización son más efectivos que los bajos, contra el virus del mosaico en tabaco. Existen características como el grado de esterificación y polimerización, que se pueden considerar al analizar el efecto de la aplicación en frutos de oligosacarin



provenientes de las pectinas de paredes celulares, ya que dependiendo de esas características la respuesta de defensa puede ser diferente. Diversos autores señalan que la aplicación de elicitores induce un incremento en el nivel de la actividad de enzimas de defensa relacionadas con la patogénesis y del sistema oxidativo.

## 2.5. Mecanismo de Defensa de Naturaleza Proteica en Plantas y Frutos

Las plantas responden a la presión ejercida por diversos factores bióticos y abióticos a través de diferentes mecanismos de defensa; éstos pueden ser activados mediante la aplicación de elicitores, los cuales incluyen carbohidratos, lípidos, glicoproteínas, glicopéptidos, entre otros (Trouvelot et al., 2014). Los elicitores también se pueden derivar de las paredes celulares de las plantas durante los procesos de crecimiento y desarrollo, o bien durante la interacción planta-patógeno, misma que ocurre después de la hidrólisis causada por enzimas degradativas del patógeno (Boudart et al., 2003).

Se ha demostrado ampliamente que durante la interacción planta-patógeno, la activación de los mecanismos de defensa se produce por la detección de microorganismos a través de receptores que reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos llamados PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns, por sus siglas en inglés) o MAMPs (Microbe Associated Molecular Patterns) (Boller y Felix, 2009).

El reconocimiento de las PAMPs y MAMPs lleva a la activación de un dominio cinasa de los receptores PRR, que inician la fosforilación y la posterior cascada compleja de traducción de señales que conducen a la activación de genes de defensa (Macho y Zipfel, 2014). Esta expresión de genes permite la síntesis de proteínas relacionadas a la patogénesis (PRs) como las enzimas hidrolíticas  $\beta$ -1,3-glucanasas, quitinasas, defensinas, entre otras; además la acumulación de

fitoalexinas y el reforzamiento de la pared celular (Trouvelot et al., 2014). Las PRRs vegetales, son receptores tipo quinasas (RLKs) o receptores tipo proteínas (RLPs), que se localizan en la membrana plasmática y poseen un dominio extracelular (Shiu y Bleecker, 2003). Los principales tipos de PRR son ricos en leucina (LRR) o en lisina (LysM); por ejemplo, los RLKs-LysM y RLP, reconocen unidades de N-acetil-D-glucosamina con enlaces  $\beta$ -1,4, las cuales están presentes en la quitina de la pared de los hongos y los peptidoglicanos que se encuentran presentes en las paredes de bacterias (Gust et al., 2012). Al parecer la única quinasa asociada a la pared (WAK1), pertenece a la familia de los genes WAK (cinco en *Arabidopsis*) y es el único receptor caracterizado (hasta el momento) por reconocer los OGs induciendo la cascada de señalización de defensa (Wolf et al., 2012).

También se ha confirmado *in vitro* que los oligómeros de pectinas, funcionan como señales biológicas que estimulan respuestas de defensa, como la biosíntesis de fitoalexinas, proteínas relacionadas a la patogénesis, proteinasas inhibitoras y lignina (Côté y Hahn, 1994; Boudart et al., 1998). Por ejemplo en plantas de frijol resistentes a *Colletotrichum lindemuthianum*, los fragmentos de OGs indujeron un incremento en la expresión de  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas, respuesta que no se observó en las plantas susceptibles (Boudart et al., 1998).

Las proteínas relacionadas a la patogénesis (PR's) se sintetizan en respuesta a la infección por patógenos tales como hongos, bacterias o virus (Van Loon et al., 1994; Thanseem et al., 2005), así como en respuesta a la aplicación de elicitores biológicos como el quitosano o fragmentos de pared celular (Mercier et al., 2000; Sánchez-Estrada et al., 2009). También son sintetizadas a consecuencia de heridas hechas a la planta o por la aplicación de sustancias químicas como el acetileno o el ácido salicílico (Hoffmann-Sommergruber, 2002; Zhao et al., 2005). Estas enzimas fueron identificadas inicialmente en tabaco y clasificadas en cinco familias basadas en la homología de su secuencia de aminoácidos (Van Loon y Van Kammen, 1970). Constituían un

grupo de proteínas ácidas que generalmente se encontraban en el espacio extracelular y un grupo de proteínas básicas que eran transportadas a vacuolas por un péptido señal, localizado en el carboxilo terminal (Van Loon y Van Strien, 1999).

Años más tarde, la clasificación se extendió a 14 familias entre las que se encuentran: quitinasas, glucanasas, endoproteinasas, peroxidasas, así como pequeñas proteínas semejantes a defensinas, tioninas y proteínas transportadoras de lípidos (Van Loon y Van Strien, 1999). Una de las funciones de varias familias de enzimas es la limitación de la actividad del agente patógeno, su crecimiento y su propagación, las cuales son identificadas como las PR-2, la familia de las  $\beta$ -1,3-endoglucanasas y las PR-3, -4, -8 y -11 de las endoquitinasas, que pueden degradar la pared de los hongos (Van Loon et al., 2006; Vidhyasekaran, 2008). En un estudio donde aplicaron fragmentos de ramnogalacturonano I a células de plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus*), se observó un aumento en la actividad de las enzimas  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa (Dinand et al., 1997).

Las  $\beta$ -glucanasas son enzimas que degradan  $\beta$ -glucanos y se clasifican en dos grandes grupos según los mecanismos que utilizan para hidrolizar el sustrato e identificadas por los productos de hidrólisis: (i) las exo- $\beta$ -glucanasas, las cuales hidrolizan el sustrato por ruptura secuencial de residuos de glucosa desde el extremo no reductor, y (ii) las endo- $\beta$ -glucanasas, que rompen aleatoriamente los sitios de enlace  $\beta$  de la cadena del polisacárido, liberando pequeños oligosacáridos con actividad elicitora (Okinaka et al., 1995). Las quitinasas son enzimas que catalizan el rompimiento de la quitina, un polisacárido de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) con enlaces  $\beta$  (1, 4). Estas son enzimas que fueron reconocidas en base a la homología de la secuencia de aminoácidos y la presencia o ausencia de un dominio de unión a quitina (CBD, por sus siglas en inglés: Chitin binding domain) (Vidhyasekaran, 2007).

El estrés biótico y abiótico también activa enzimas relacionadas con el estrés oxidativo como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasa (POD) y glutatión reductasa (GR). Estas enzimas protegen contra el daño causado por radicales libres o especies reactivas de oxígeno (superóxido, oxígeno singulete y radical hidroxilo) generados por distintos tipos de estrés (Wang, 1995). Pradeep y Jambhale (2002) sugirieron que los compuestos fenólicos y enzimas oxidativas son en su mayoría considerados como uno de los parámetros bioquímicos importantes para la resistencia a las enfermedades. Trouvelot et al. (2014), reportaron un incremento sustancial de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la activación de proteínas relacionadas a la patogénesis (PRs) en tomate aplicado con una solución de oligogalacturónidos. Asimismo, Osorio et al. (2011) reportaron un incremento en la expresión del gen de la peroxidasa en fresa por efecto de la aplicación de oligogalacturónidos parcialmente desmetilados. Por otra parte, Ojha y Chatterjee (2012) reportaron que la actividad de la peroxidasa fue mayor en hojas de tomate infectadas por *Fusarium oxysporum* que en las sanas. Con esto se puede concluir que tanto las enzimas relacionadas a la patogénesis como las enzimas oxidativas pueden ser utilizados como indicadores de la activación del mecanismo de defensa tanto en plantas como en frutos. Por lo que es posible que la aplicación de elicitores de origen péctico induzca un incremento en el nivel de la actividad de estas enzimas.

### **III. HIPÓTESIS**

Los fragmentos de ramnogalacturonano I incrementan los niveles de la actividad de enzimas relacionadas a la patogénesis como la quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa, así como los niveles de la actividad de la peroxidasa en frutos de tomate.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad elicitora de los fragmentos de ramnogalacturonano I sobre la activación del mecanismo de defensa enzimático de frutos de tomate.

### 4.2. Objetivos Específicos

- ❖ Obtener y caracterizar parcialmente los fragmentos de ramnogalacturonano I, productos de la degradación enzimática con la RG Liasa.
- ❖ Determinar el efecto de los fragmentos de ramnogalacturonano I sobre los niveles de la actividad de las enzimas quitinasa,  $\beta$ -1,3-glucanasa y peroxidasa.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se realizó en dos etapas: la primera consistió en la obtención y caracterización parcial de fracciones de ramnogalacturonano (RG I); mientras que la etapa II consistió en evaluar el efecto elicitor de los fragmentos de RG I sobre el mecanismo de defensa enzimático en frutos de tomate midiendo la actividad enzimática de quitinasa,  $\beta$ -1,3-glucanasa y peroxidasa.

### 5.1. Etapa I. Obtención y Caracterización Parcial de Fragmentos de RG I

#### 5.1.1. Obtención de Fracciones de RG I

Las fracciones de RG I se obtuvieron por degradación enzimática de acuerdo al método reportado por Mckie et al. (2001) y Wu y Mort (2014) con algunas modificaciones. Se utilizaron 150 mg de RG I de papa (0.05%, Megazyme), los cuales se suspendieron en 300 mL de buffer Tris base 20 mM pH 9.5 con 1mM de  $\text{CaCl}_2$  en agitación constante. Se añadió el equivalente a 55 unidades de la RG liasa (Ramnogalacturonano Liasa 11A *Cellvibrio japonicus* (CjRgl11A, PL11) y se incubó durante 48 h a 37 °C. Se determinó el tiempo de incubación necesario para la obtención de fragmentos con capacidad elicitora, para lo cual se tomó muestra de la degradación enzimática a distintos tiempos de incubación (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, y posteriormente cada 3 h hasta las 48 h) y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 235 nm, longitud a la cual es posible medir la formación de dobles enlaces originados por la  $\beta$ -eliminación (Ochiai et al., 2006; Silva et al., 2016). Se seleccionaron las

fracciones con capacidad elicitora, la cual se determinó en base a pruebas preliminares. Las fracciones seleccionadas se dializaron en membranas de 10 kDa (MWCO) (Wu y Mort, 2014), se liofilizaron y se mantuvieron en un desecador hasta su posterior análisis.

### **5.1.2. Caracterización Parcial de RG I y sus Fragmentos**

5.1.2.1. Determinación de las Bandas de Absorción Asociadas a Enlaces Químicos Mediante Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR). Se obtuvieron los espectros de absorción de infrarrojo del RG I y sus fragmentos empleando la técnica de reflectancia total atenuada (ATR) en un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier Thermo Scientific Nicolet, modelo iS50. Se realizaron barridos a una resolución estándar de  $0.09\text{ cm}^{-1}$ . Se obtuvieron los valores espectrales como frecuencia, intensidad y área de banda, con un rango de detección de  $400\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$ , de acuerdo al método reportado por Gnanasambandam y Proctor (2000).

5.1.2.2. Determinación de la Distribución de Pesos Moleculares. Se realizó la determinación de la distribución de pesos moleculares de acuerdo a la técnica reportada por Carvajal-Millan et al. (2005). Se utilizó cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (SE-HPLC) a  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ , una columna TSKgel G500 PMWX ( $7.8\text{ x }300\text{ mm}$ , Tosoh Bioscience Supelco, Carolina, USA) y un detector de índice de refracción (2414 de Waters). La elución fue isocrática a  $0.6\text{ mL/min}$  con  $\text{LiNO}_3\text{ }50\text{ mM}$ , filtrado a través de  $0.45\text{ }\mu\text{m}$ . Las masas molares se determinaron en base a la calibración obtenida con estándares de pululanos.

5.1.2.3. Determinación de Viscosidad Intrínseca y Peso Molecular por Dispersión de Luz. Se determinaron estas variables mediante cromatografía de



alta resolución de exclusión por tamaño (HPSEC) a temperatura ambiente con un sistema compuesto por una columna Shodex OH SB-G (Showa Denko, Tokyo Japan) seguido en serie (Shodex OHpak SB-804 HQ y Shodex OHpak SB-804 HQ). Se utilizó como eluyente solución reguladora de nitrato de sodio 50 mM conteniendo 0.02% (p/v) de azida de sodio como un agente antibacterial a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. El eluyente se analizó en línea con los siguientes detectores:

- i) UV 1260 Infinity a 280 nm (Agilent, U.S.A.).
- ii) Dispersión de luz (light scattering, LS) modelo DAWN8+ (Wyatt, Santa Barbara, U.S.A.).
- iii) Viscosímetro diferencial en línea (DV) modelo ViscoStar II (Wyatt, Santa Barbara, U.S.A.).
- iv) Refractómetro diferencial (RI) con rango extendido modelo Optilab T-rEX (RI) (Wyatt, Santa Barbara, U.S.A.).

El peso promedio de las masas molares, la viscosidad intrínseca, la polidispersidad y el radio hidrodinámico fueron calculados y analizados usando el software ASTRA versión 6.1.2.84 (Wyatt, Santa Barbara, U.S.A.). El diferencial del índice de refracción (dn/dc) utilizado fue de 0.146 mL/g para RG I (Morris et al., 2008; Morris et al., 2010).

5.1.2.4. Determinación del Perfil de Azúcares Neutros por Cromatografía de Gases. Se determinó el perfil de azúcares en las fracciones de RG I de acuerdo a la técnica reportada por Blakeney et al. (1983), en la cual se realizó una hidrólisis, seguida de una reducción y una acetilación.

Hidrólisis: Se pesaron 20 mg del RG I y sus fracciones liofilizadas y se les añadió 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 N y 0.5 mL de inositol como estándar interno (1 mg/mL), se agitaron por 2 min y se colocaron en un baño maría a 100 °C

durante 2 horas. Se dejó enfriar la mezcla y se adicionaron 0.5 mL de amoníaco al 25%.

Reducción: Alícuotas de 0.15 mL fueron reducidas con 1 mL de solución de borohidruro de sodio/dimetilsulfóxido ( $\text{NaBH}_4/\text{DMSO}$ ). Posteriormente las muestras se colocaron a  $35^\circ\text{C}$  por 90 min y después se eliminó el exceso de  $\text{NaBH}_4$  adicionando 0.1 mL de ácido acético glacial y se dejó enfriar en hielo.

Acetilación: A la mezcla anterior se adicionaron 0.15 mL de metilimidazol con 2 mL de ácido acético anhidro, se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 20 min y se adicionaron 2 mL de cloroformo. Se agregaron 6 mL de agua mili-Q para eliminar el exceso de ácido, se agitaron y se dejaron decantar separándose en dos fases, de las cuales la fase superior fue retirada con una pipeta Pasteur (los lavados con agua se repitieron 3 veces) y la fase inferior fue recuperada cuidando de no extraer agua, colocando en viales de inyección de 1 mL.

Condiciones cromatográficas: Se utilizó una columna tipo BD225 (50% cianopropilfenil-Dimetilpolisiloxano, Teknokroma) de 0.32 mm x 30 m en un cromatógrafo de gases modelo Agilent Technologies 6890N, utilizando hidrógeno como gas acarreador y un detector de índice de refracción. La temperatura del horno y del detector fue de  $205^\circ\text{C}$  y  $260^\circ\text{C}$ , respectivamente, seguida de una rampa de temperatura de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  de  $140^\circ\text{C}$  a  $230^\circ\text{C}$  y la inyección se llevó a cabo a  $220^\circ\text{C}$ . La identificación de los azúcares, se realizó con base en los tiempos de retención de los estándares comerciales: arabinosa, ribosa, galactosa, xilosa, ramnosa y glucosa (Sigma, México). Los estándares se prepararon a una concentración de 1 mg/mL con agua ultrapura, se les adicionó 0.4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  7.5 N y 0.5 mL de amoníaco al 25% y se siguieron todos los pasos descritos para hidrólisis, reducción y acetilación, excepto que no se dejaron por 2 horas en baño maría.

5.1.2.5. Determinación del Contenido de Ácido Galacturónico. Se determinó el contenido de ácido galacturónico en el RG I sin fraccionar y en las fracciones por medio de la técnica reportada por Taylor y Buchanan-Smith (1992) y Taylor (1993). Se utilizaron 200  $\mu$ L de la muestra diluida en agua (100  $\mu$ g/mL), 3 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%) y 100  $\mu$ L de carbazol al 0.1% w/v (diluido en etanol 100%). Posteriormente los tubos se incubaron a 60 °C en baño maría durante 1 hora y después se enfriaron en agua a temperatura ambiente. Se midió el desarrollo del color rosa-rojo a una longitud de onda de 530 nm a temperatura ambiente y se eliminó la absorbancia debida a otros compuestos utilizando un blanco de reactivo (sin muestra) en un espectrofotómetro HACH modelo DR500 UV-Visible. Se generó una curva de calibración con distintas concentraciones de ácido galacturónico y una  $R^2$  de 0.99. Los resultados se expresaron como  $\mu$ g de ácido galacturónico/mL.

## 5.2 Etapa II. Efecto Elicitor de Fragmentos de RG I en Tomate

### 5.2.1. Selección del Material Vegetal

Se utilizó tomate tipo bola variedad Estrella en estado de madurez rosa (estado de color 4 según la USDA), sin daños y con firmeza uniforme. Los frutos fueron transportados del mercado de abastos de Hermosillo, Son., al laboratorio de Biotecnología Vegetal y Postcosecha, de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal del CIAD, A.C. Se lavaron con hipoclorito de sodio 150 ppm, se enjuagaron, secaron, se dividieron en tres lotes de 27 frutos cada uno, se colocaron en cajas de plástico y se mantuvieron a 20 °C con una humedad relativa aproximada de 85 %.

### **5.2.2. Aplicación de Fragmentos de RG I**

A los lotes de frutos se aplicaron por aspersion, dos soluciones conteniendo diferentes fragmentos de RG I a una concentración de 30  $\mu\text{M}$  y se dejaron actuar durante 48 horas (Dinand et al., 1997). Estos fragmentos fueron seleccionados previamente en base a pruebas preliminares, en las cuales se observó que eran los que inducían una mayor respuesta elicitora. Se tomaron muestras del pericarpio de tomate a diferentes tiempos 0, 0.5, 1, 6, 24 y 48 h. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno, se liofilizaron y se colocaron en un desecador para su posterior análisis. A cada una de las muestras obtenidas se les determinó el contenido de proteína y la actividad de las enzimas  $\beta$ -1,3-glucanasa, quitinasa y peroxidasa.

### **5.2.3. Determinación de la Concentración de Proteína**

Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el ensayo de proteína de Bio-Rad (Bio-rad Laboratories) basado en el método de Bradford (1976). Se utilizó como estándar albúmina bovina (BSA) para la curva de calibración. La mezcla de reacción consistió en 100  $\mu\text{L}$  de extracto de tomate, se adicionaron 400  $\mu\text{L}$  del reactivo Bradford y 1500  $\mu\text{L}$  de agua. Posteriormente se homogenizaron y se midió la absorbancia del compuesto coloreado formado a una longitud de onda de 590 nm contra un blanco de reactivo (sin muestra), en un espectrofotómetro HACH modelo DR500 UV-Visible. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de proteína/mL.

### **5.2.4. Obtención de Extracto Proteico y Determinación de la Actividad Enzimática de la $\beta$ -1,3-Glucanasa**

Se preparó un extracto proteico de acuerdo a la técnica reportada por Sela-Buurlage et al. (1993) y Cota et al. (2007) con modificaciones. Para cada uno de

los tratamientos y muestreos se utilizaron 0.2 g de muestra liofilizada. Posteriormente se agregaron 10 mL de buffer de acetato de sodio 100 mM (pH 5.5) con 0.1% de  $\beta$ -mercaptoetanol, se homogenizaron a 4 °C durante 2 minutos en un homogeneizador Ultra TurraxT-25 con un vástago de 8 mm de diámetro. Se filtró en organza y se centrifugó a 12 000 g en una centrifuga Allegra X-30R Beckman Coulter durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante considerado como extracto se almacenó a -80 °C, en caso de no ser usado inmediatamente.

La determinación de la actividad enzimática se realizó por el método del ácido 3,5-nitrosalicílico (DNS) reportado por Abeles (1970) y Chaplin (1986) con modificaciones. Este método se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo). Se tomaron 50  $\mu$ L extracto y se mezclaron con 900  $\mu$ L de buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7; posteriormente se adicionaron 50  $\mu$ L del sustrato laminarina y se comparó contra un blanco de muestra y uno de sustrato. Se incubaron por 1.5 horas a 40 °C, se les agregaron 1000  $\mu$ L del reactivo DNS y se dejaron en baño maría por 5 minutos a 100 °C. Una vez que ocurrió el cambio del color amarillo a rojo, se sacaron y se enfriaron en agua a temperatura ambiente, para después detener la reacción agregándoles 80  $\mu$ L de tartrato de sodio y potasio y por último se midió la absorbancia a 540 nm. Se utilizó una curva estándar de glucosa con una  $R^2$  de 0.99. Todo esto se realizó en obscuridad (luz roja). La actividad específica de la  $\beta$ -1,3-glucanasa fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 mMol de glucosa liberada/min.mg de proteína y los resultados se reportaron como U/mg proteína.

### **5.2.5. Determinación de la Actividad Enzimática de la Quitinasa**

A partir del extracto proteico preparado en la sección anterior se determinó la actividad de la quitinasa por fluorometría, por el método de Cota et al. (2007) con ligeras modificaciones. La mezcla de reacción se preparó utilizando 10  $\mu\text{L}$  del extracto, 5  $\mu\text{L}$  de 4-Metilumbeliferona  $\beta$ -D-N, N', N'' triacilquitotriósido (4-Mu) y 35  $\mu\text{L}$  del buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7; esta mezcla se comparó contra un blanco de 4- Metilumbeliferona (4-Mu). La mezcla de reacción se colocó en baño maría durante 5 minutos a 37 °C. Después de la incubación la reacción se detuvo agregando inmediatamente, al blanco y a la muestra, 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.2 M. Posteriormente se colocaron en un Fluorómetro Turner BioSystems modelo TBS-380 en UV usando una longitud de onda de excitación de 325 nm y de emisión de 446 nm. Se determinó la actividad en base a la fluorescencia utilizando una curva de calibración de 4-Mu, la cual se preparó a partir de una solución madre de 4-Mu 1 M disuelto en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.2 M, de la cual se prepararon las concentraciones de 10-500 mM de 4-Mu. La actividad específica de la enzima quitinasa se definió como la liberación de 1  $\mu\text{Mol}$  de 4-Mu/min.mg de proteína. Los resultados se reportaron en U/mg de proteína.

### **5.2.6. Obtención del Extracto Proteico y Determinación de la Actividad Enzimática de la Peroxidasa.**

A partir del pericarpio de tomate liofilizado se obtuvo un extracto proteico para la determinación enzimática de la peroxidasa, de acuerdo al método reportado por Lamikanra (1995) con algunas modificaciones. Se tomaron 0.2 g de tejido liofilizado, se agregaron 5 mL de buffer de Tris-HCl, 100 mM pH 7.1 con 1% de polivinilpirrolidona (PVP) y se homogenizó a 4 °C durante 30 segundos en un homogeneizador Ultra Turrax T-25 con un vástago de 8 mm de diámetro. Posteriormente se centrifugó a 10 000 g en una centrifuga refrigerada Allegra X-30R Beckman Coulter durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante (extracto) se almacenó a -80 °C, en caso de que no fuera usado inmediatamente.

La determinación de la actividad enzimática se realizó de acuerdo al método de Flurkey y Jen (1978) con las siguientes modificaciones. La mezcla de reacción se preparó con 2.6 mL de buffer Tris-HCl 100 mM frío (pH 7.1), 0.25 mL de guayacol 0.1 M, 0.1 mL de peróxido de hidrógeno al 0.25 % y 50  $\mu$ L del sobrenadante o extracto. La mezcla de reacción se colocó en un espectrofotómetro HACH modelo DR500 UV-Vis y se determinó la absorbancia a 470 nm durante 3 minutos. La actividad específica de la peroxidasa se definió como la formación de 1 mMol de tetraguaiacol/min.mg de proteína y los resultados se reportaron en U/mg proteína.

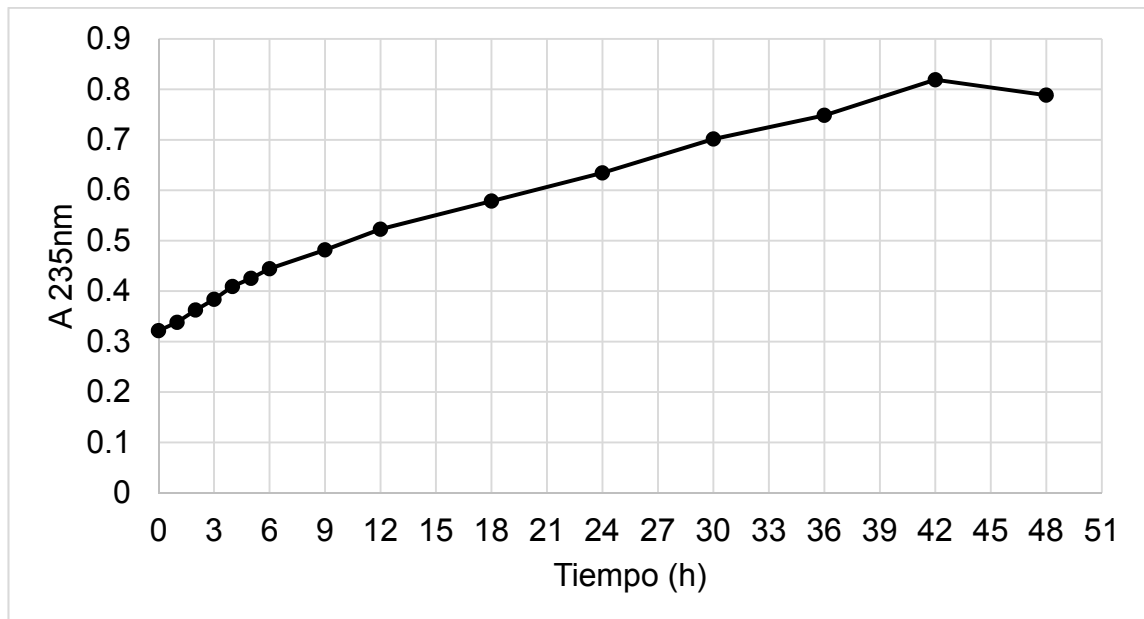
### 5.3. Diseño de Experimentos

Se utilizó un análisis descriptivo para la etapa de la caracterización de los fragmentos de RG I. Para la etapa del efecto bioelicitador de los fragmentos de RG I sobre el mecanismo de defensa enzimático en tomate, se realizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial con 3 repeticiones, donde el factor A fueron los tratamientos (testigo, fracción 1 y 2), y B los tiempos de muestreo (0, 0.5, 1, 3, 6, 24 y 48 horas). Las variables de respuesta fueron las actividades enzimáticas. Para determinar el efecto de los fragmentos de RG I sobre las variables de respuesta se realizó un análisis de varianza de dos vías. Para la comparación de medias se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95%, mediante el paquete de análisis estadísticos NCSS 6.0 versión 2007.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Caracterización Parcial de RG I y sus Fragmentos

En el presente estudio se utilizó el ramnogalacturonano I de papa comercial para la obtención de fragmentos con potencial capacidad elicitora del mecanismo de defensa natural del tomate. En la **Figura 6** se presentan los resultados de la degradación enzimática del RG I con la RGL, en la cual se puede observar que la absorbancia aumentó con respecto al tiempo, indicando la formación de dobles enlaces originados por la  $\beta$ -eliminación (**Figura 7**) en el ácido galacturónico entre el C4 y C5. Es importante mencionar que hasta el momento no se han encontrado estudios científicos que reporten la curvan de degradación enzimática del RG I utilizando la RGL, por lo que no se pudieron comparar nuestros resultados.



**Figura 6.** Degradación enzimática del RG I de papa con la RG liasa.

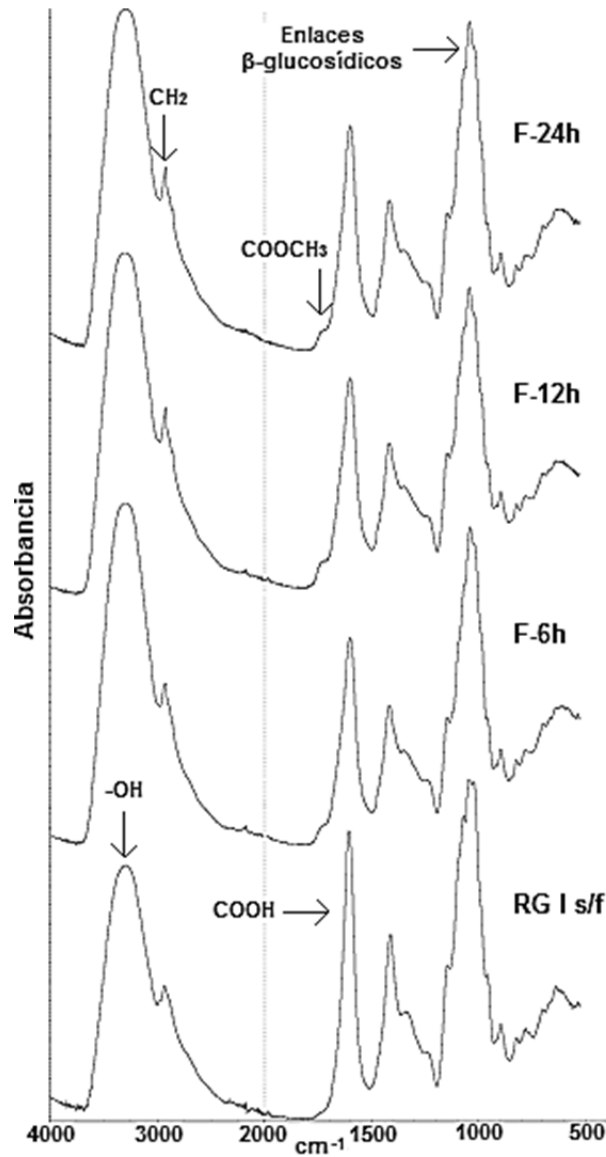




enzimática con la enzima RG liasa. En el espectro del RG I sin fraccionar se observó la presencia de las siguientes bandas de absorción: entre los 3300-3500  $\text{cm}^{-1}$  se encuentra la banda que se asocia a la vibración de los enlaces OH, entre los 2900-3000  $\text{cm}^{-1}$  la vibración de los enlaces CH, entre los 1500-1650  $\text{cm}^{-1}$  la banda de absorción del doble enlace C=O asociada a los ácidos carboxilos, entre los 897-1158  $\text{cm}^{-1}$  la vibración del enlace C-OH con hombros en ambos lados de la banda y que pueden estar relacionados con los enlaces antisimétricos C-O-C (modo de estiramiento de enlaces  $\beta$ -glucosídicos), además de que esta última banda se conoce como la huella dactilar de los polisacáridos. Por otro lado, también se encontraron entre los 1000-1200  $\text{cm}^{-1}$  la vibración de los enlaces C-O y entre los 700 y 900  $\text{cm}^{-1}$  la vibración de los enlaces C-C de los anillos benzoicos. No se observó ninguna banda en la región de los 1750  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente la banda de absorción del doble enlace C=O asociada a los ésteres, lo que indica que en el RG I sin fraccionar se encuentra desmetil-esterificado. Estos resultados coinciden con los reportados por Urias-Orona et al. (2010) en pectina de garbanzo, González-Estrada et al. (2015) en harina de trigo y Kandekar et al. (2015) en mucílago de linaza (conformado por RG I y arabinosilanos), así como por Kravtchenko et al. (1992) y Voragen et al. (2009), quienes reportaron que el RG I de células vegetales no está metil-esterificado. Otros estudios asocian una banda de 1072  $\text{cm}^{-1}$  a unidades de galactosa presentes en RG I (Kacurakova et al., 2000), banda que fue observada en el presente estudio sugiriendo la presencia de galactosa en el RG I de papa.

Las fracciones de RG I presentaron espectros de FT-IR diferentes al observado en RG I sin degradar enzimáticamente. Al degradar el RG I se observó una banda más pronunciada en la región de 2950  $\text{cm}^{-1}$ , la cual corresponde al estiramiento de los átomos de C-H asociado a los grupos  $\text{CH}_2$ . Asimismo, se observó la presencia de una banda en la región de 1750  $\text{cm}^{-1}$ . Esta banda se relaciona con una metil-esterificación de los grupos carboxílicos, sin embargo es necesario realizar otros estudios que determinen con precisión la metil-

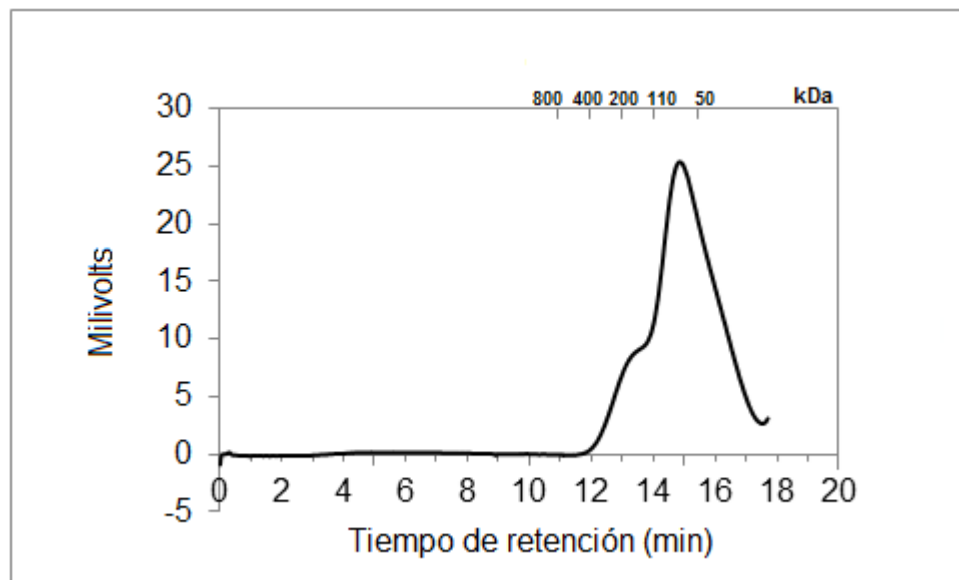
esterificación. Adicionalmente, la altura de la banda observada en la región de los 1500-1650  $\text{cm}^{-1}$  y que se relaciona a los grupos carboxílicos, disminuyó con respecto a la observada en el RG I sin fraccionar.



**Figura 8.** Espectros FTIR de RG I sin fraccionar (s/f) y fracciones obtenidas por degradación de la RG liasa durante 6, 12 y 24 horas de incubación. Están marcados por medio de flechas algunos grupos funcionales.

### 6.1.2. Análisis de la Distribución de Pesos Moleculares

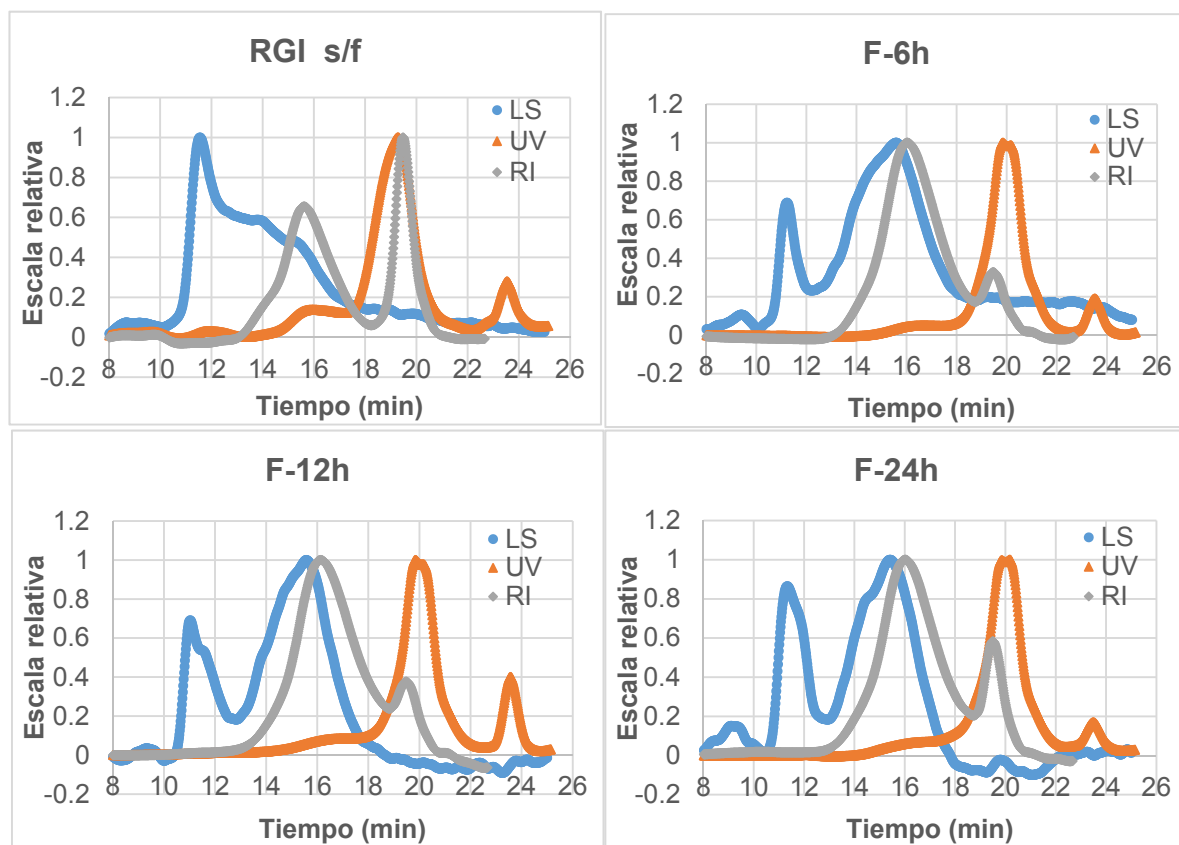
El perfil de distribución de pesos moleculares del RG I se muestra en el cromatograma de la **Figura 9**. Se puede apreciar la presencia de un pico entre los tiempos de retención de 14 y 15.5 min, región que corresponde a los pesos moleculares pequeños (110-50 kDa). También se registró un hombro en el pico a un tiempo de retención de 12-13.6 min que corresponde al RG I con pesos moleculares estimados entre 400 y 200 kDa. De acuerdo a este patrón de elusión, se considera que el RG I es polidisperso con un peso molecular aparente en un rango amplio de 400-50 kDa. Sin embargo, considerando la banda mayoritaria se estima un peso aproximado de 64 kDa. Estos resultados coinciden con los reportados por Khodaei y Karboune (2013), quienes reportaron una distribución de peso molecular estimado de 50 a 500 kDa para el RG I de papa. El RG I utilizado en el presente estudio fue de la casa comercial Megazyme (Mckie et al., 2001).



**Figura 9.** Perfil de distribución de pesos moleculares de RG I de papa sin fraccionar por SE-HPLC. En la parte superior se muestran los pululanos como marcadores del peso molecular (kDa) y como escala de calibración.

### 6.1.3. Determinación de la Viscosidad Intrínseca y Peso Molecular por Dispersión de Luz

Los resultados de la distribución de pesos moleculares por dispersión de luz (LS, por sus siglas en inglés), la presencia de proteína determinada por luz ultravioleta (UV) y azúcares determinados por el índice de refracción (RI) en el RG I sin fraccionar y sus fracciones se presentan en la **Figura 10**. Los picos de LS muestran que la distribución de pesos moleculares del RG I fue disminuyendo con respecto al tiempo de degradación enzimática. El RG I sin fraccionar (RG I s/f) se diferenció con las tres fracciones obtenidas después de las 6, 12 y 24 h de degradación (F-6h, F-12h y F-24h), en un pico que disminuyó en los tiempos de 10-12 min, correspondiente a pesos moleculares altos. Así mismo, un segundo pico se formó en las fracciones al tiempo de retención de 13-18 min, el cual corresponde a pesos moleculares pequeños (**Cuadro 1**). La absorbancia en UV (280 nm) permite observar la presencia de proteína tanto en el RG I s/f como en el fraccionado; en los cuales al parecer disminuyó ligeramente su concentración (Goh et al., 2006). En cuanto al diferencial de índice de refracción (RI), en las figuras se observan dos picos, uno entre 14-18 min correspondiente a azúcares neutros y otro a los 19 min el cual corresponde a azúcares neutros sin ácido galacturónico que están presentes en las cadenas laterales (Morris et al., 2010). El comportamiento de estos azúcares neutros fue diferente entre el RG I s/f y sus fragmentos. En el RG I s/f el pico de azúcares neutros fue menor con respecto al pico de azúcares neutros libres de ácido galacturónico; mientras que en los fragmentos del RG I el pico de azúcares neutros libres de ácido galacturónico, disminuyó considerablemente y aumentó el de azúcares neutros.



**Figura 10.** Cromatogramas HPSEC de RG I de papa sin fraccionar (s/f) y fraccionado mediante degradación con la RG liasa durante 6, 12 y 24 horas. Las diferentes líneas indican las mediciones de dispersión de luz (LS), absorbancia (UV) y diferencial de índice de refracción (RI).

En el **Cuadro 1** se observan claramente las diferencias en los pesos moleculares ( $M_w$ ), viscosidad intrínseca ( $[\eta]_w$ ), polidispersidad ( $P$ ) y radio hidrodinámico ( $R_h(v)_w$ ); así como las constantes  $K$  y  $\alpha$  generadas por las diferentes características del polímero. El  $M_w$  del RG I de papa fue de 53 kDa, el cual es aproximadamente 3.5 veces menor comparado con el peso molecular del RG I de remolacha azucarera (188 kDa), donde hidrolizaron el polímero con las enzimas endopoligalacturonasas y pectinmetilesterasas (Morris et al., 2010). Esta diferencia puede ser debida a diversos factores tales como el origen del RG I el cual fue diferente, así como la variedad, distintos métodos de obtención, entre otros, generando una polidispersidad que está dada por la conformación y el número de sus cadenas poliméricas. Respecto a la viscosidad intrínseca ( $[\eta]_w$ ), el RG I de papa presentó un valor de 41 mL/g, el cual fue similar al reportado para el RG I de la remolacha (36 mL/g). Estudios previos señalan que en la remolacha la  $[\eta]_w$  es relativamente baja para una molécula de esa masa molar, lo que puede ser un reflejo de que ese RG I tiene una conformación más compacta en comparación con el de papa, la cual es más extendida y por lo tanto la viscosidad es similar (Oosterveld et al., 2002; Morris et al., 2010).

El peso molecular ( $M_w$ ) del RG I s/f fue de 60-70% mayor que el de las fracciones, esto era de esperarse debido al tiempo de hidrolisis enzimática que asociado con la polidispersidad, se pudo observar que está conformado por una distribución de pesos moleculares que siguen casi el mismo patrón de comportamiento, excepto la fracción de 12 h que disminuye 0.1 su polidispersidad con respecto a la fracción de 24 h. La disminución del  $M_w$  también fue reportado por Sousa et al. (2015), quienes utilizaron una degradación enzimática (arabinasas y galactanasas) en la pectina de cítricos lo cual eliminó las cadenas laterales (arabinanos y galactanos) del RG I. También reportaron que la  $[\eta]_w$  se mantuvo constante a pesar de los tratamientos enzimáticos, por lo que asociaron el cambio en la viscosidad intrínseca únicamente cuando existen alteraciones en la cadena principal del RG-I como en el caso del presente trabajo. En cuanto a la viscosidad intrínseca de las

fracciones, ésta disminuye entre ellas lo que puede ser debido a que con respecto al tiempo de degradación enzimática, se va disminuyendo la probabilidad de que la enzima corte en el enlace requerido. El radio hidrodinámico ( $R_h(v)_w$ ) de las moléculas formadas en disolución disminuyó 1.6 veces con respecto a la fracción del tiempo de hidrólisis de las 24 h. Por otro lado, las constantes  $K$  y  $\alpha$  experimentales indican que la interacción polímero-disolvente de las fracciones (F-6, 12 y 24 h) se encuentran en una conformación de ovillo aleatorio en un buen solvente (Goh et al., 2006; Sousa et al., 2015).



**Cuadro 1.** Propiedades moleculares del RG I de papa y fracciones obtenidas por degradación enzimática de la RG liasa.

<b>Muestra</b>	<b>M<sub>w</sub> (kDa)</b>	<b>[η]<sub>w</sub> (mL/g)</b>	<b>P M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub></b>	<b>Rh(v)<sub>w</sub> (nm)</b>	<b>K (mL/g)</b>	<b>α</b>
<b>RG I s/f</b>	53	41	1.6	6.5	0.30	0.47
<b>F-6h</b>	29	29	1.5	4.8	0.14	0.54
<b>F-12h</b>	20	27	1.4	4.3	0.11	0.57
<b>F-24h</b>	16	26	1.5	3.9	0.22	0.50

M<sub>w</sub>=Peso molecular promedio, [η]<sub>w</sub>=Viscosidad intrínseca, P=Polidispersidad, Rh(v)<sub>w</sub>=Radio hidrodinámico, M<sub>n</sub>= Masa molar promedio en número (dato no mostrado), constantes K y α.

#### 6.1.4. Perfil de Azúcares Neutros y Contenido de Ácido Galacturónico

En el **Cuadro 2** se puede observar la composición de azúcares neutros y ácido galacturónico del RG I sin fraccionar (s/f) y de los fragmentos. En el RG I s/f, el alto contenido de galactosa (10%) sugiere la presencia de cadenas laterales de galactanos y en menor proporción de mananos (1% de manosa) y arabinoxilanos (relación Ara/Xil 0.65). También se encontraron en menor porcentaje otros azúcares neutros como la glucosa, indicando que están presentes algunas unidades de glucosa (Obro et al., 2004). En los 3 fragmentos el contenido de azúcares neutros aumenta y el contenido de ácido galacturónico disminuye, este mismo comportamiento se pudo apreciar en el índice de refracción mostrado en la **Figura 10**. Sin embargo, se puede ver que F-24h no sigue el mismo patrón que los demás fragmentos en cuanto a la disminución del AGal; esto puede ser debido a que la molécula de RG I al ser degradada por la enzima, se genera fragmentos más pequeños que no están necesariamente distribuidos de manera regular. Lo anterior es corroborado con los resultados mostrados en el **Cuadro 1**, donde se observa que el peso molecular disminuye con respecto al tiempo de degradación pero la polidispersidad aumenta.

La degradación enzimática por la RG liasa se genera en sitios específicos dentro de la cadena principal del RG I de papa y esto se ve reflejado en la reducción del ácido galacturónico (AGal, -42.6%) y en el aumento de la ramnosa (Ram, +2.3%) y la galactosa (Gal, +2.4%) en los fragmentos F-6, 12 y 24h. Lo anterior coincide con lo reportado por Boudart et al. (1998), Obro et al. (2004) y Byg et al. (2012), quienes degradaron las muestras de pectina a través de hidrólisis ácida, y posteriormente utilizaron enzimas como galactanasas, arabinasas y poligalacturonasas, y purificaron por medio de filtración en gel para obtener fragmentos pécticos de RG I observando la disminución de ácido galacturónico y en el aumento de azúcares neutros.

**Cuadro 2.** Composición de azúcares neutros y contenido de ácido galacturónico del RG I s/f y sus fracciones (6, 12 y 24 h de degradación enzimática).

Muestra	Composición de azúcares (% en peso)							
	AGal	Ram	Gal	Glc	Ara	Xil	Man	Otros
<b>RG I s/f</b>	71.1	5.7	10.6	0.35	0.36	0.55	1.3	10.04
<b>F-6h</b>	56.7	7.6	12.5	0.62	0.34	0.66	1.5	20.08
<b>F-12h</b>	28.5	7.7	12.7	0.76	0.35	0.63	1.7	47.66
<b>F-24h</b>	45.1	8.0	13.0	0.76	0.35	0.64	1.6	30.55

s/f=sin fraccionar. AGal=Ácido galacturónico, Ram= Ramnosa, Gal= Galactosa, Glc= Glucosa, Ara= Arabinosa, Xil= Xilosa, Man= Manosa. Los azúcares fueron comparados con los tiempos de retención de los estándares.

El contenido de AGal, Ram y Gal en el RG I de papa sin fraccionar es similar a lo reportado por Boudart et al. (1998), quienes obtuvieron fragmentos pécticos de RG I purificados derivados de plantas de frijol y en los cuales el porcentaje en peso fueron 61.9, 3.9 y 19.6, respectivamente. No obstante, el contenido de estos azúcares en otros estudios de RG I de papa varía considerablemente debido a los diferentes métodos de extracción, purificación y el tipo o variedad de papa. Por ejemplo, en el estudio de Byg et al. (2012), obtuvieron de pulpa de papa un porcentaje en peso de AGal, Ram y Gal de 10.27, 4.51 y 73.35, respectivamente, lo cual fue similar a lo reportado por Obro et al. (2004). Por el contrario, Khodaei y Karboune (2013) encontraron un porcentaje en peso de AGal similar al de Gal (44.3 y 31.8, respectivamente), lo que atribuyeron al tratamiento alcalino aplicado. Además se encontró una relación AGal:Ram de 12.5, lo que coincide con lo reportado por los mismos autores, lo que puede sugerir la presencia de unidades oligoméricas de AGal. Sin embargo, esta relación disminuye con respecto al tiempo de degradación enzimática en los fragmentos por lo que podrían contener oligómeros más pequeños de AGal (Obro et al., 2004; Khodaei y Karboune, 2013).

## 6.2. Efecto Elicitor de Fragmentos de RGI en Tomate

Los resultados obtenidos de las pruebas preliminares realizadas mostraron que los fragmentos derivados de la degradación enzimática por la RGL durante 12 h (F-1) y 24 h (F-2) indujeron la mayor actividad de la peroxidasa en frutos de tomate con valores de 10.2 y 5.2 mM de tetraguaiacol/min.mL, respectivamente. Por lo anterior, se eligieron ambos fragmentos para evaluar su efecto en la inducción del mecanismo de defensa en fruto de tomate. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que la peroxidasa es una enzima que puede ser determinada en forma fácil y rápida, además de ser una enzima cuyo nivel de actividad aumenta bajo condiciones de estrés biótico y abiótico, por lo que en nuestro grupo de trabajo se ha utilizado como enzima indicadora de la activación del mecanismo de defensa en frutos.

### 6.2.1. Efecto de los Fragmentos de RG I en la Actividad Enzimática de la $\beta$ -1,3-Glucanasa

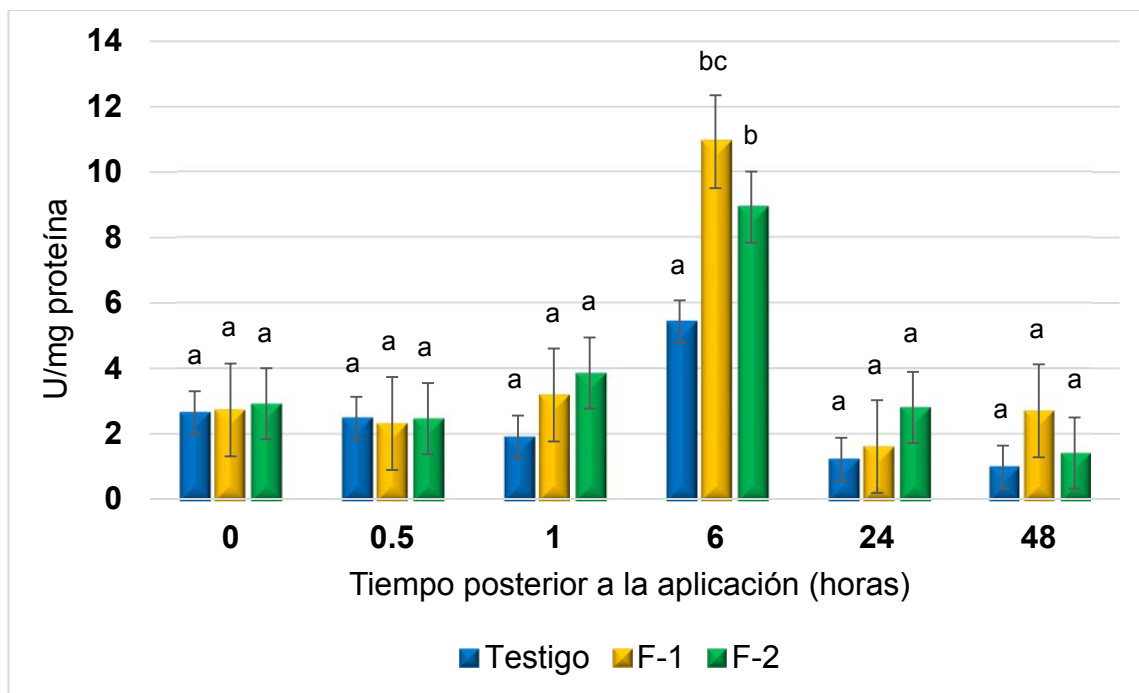
La actividad específica de la enzima  $\beta$ -1,3-glucanasa en tomate aplicado con los fragmentos de RG I durante 48 horas, se presenta en el **Cuadro 3**. Se puede observar que la actividad basal de la enzima en los frutos de tomate fue de 2.44 U/mg proteína, siendo diferente significativamente ( $p < 0.05$ ) con respecto a los tratados con los fragmentos de RG I. La aplicación de los fragmentos F-1 y F-2 indujeron 1.6 y 1.52 veces más, respectivamente el nivel de actividad de la enzima con respecto al testigo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la aplicación de ambos fragmentos (entre ellos). Los resultados de la actividad específica de  $\beta$ -1,3-glucanasa en los frutos testigo, son menores a los reportados por Cota et al. (2007), quienes registraron niveles de actividad de esta enzima de 16.45, 46.85 y 75 U/mg proteína en las variedades Sunpride, Charleston y Jerónimo, respectivamente. Es muy posible que estas diferencias se deban a las diferencias genéticas que existen en diferentes variedades de tomate.

**Cuadro 3.** Efecto de los fragmentos de RG I en la actividad específica de  $\beta$ -1,3-glucanasa en frutos de tomate.

<b>Tratamiento</b>	<b>Actividad Específica (U/mg proteína)</b>
<b>Testigo</b>	$2.44 \pm 0.46^a$
<b>F-1 (12 h)</b>	$3.91 \pm 0.81^b$
<b>F-2 (24 h)</b>	$3.73 \pm 0.68^b$

Las medias con superíndices distintos indican diferencias estadísticas; n=18.

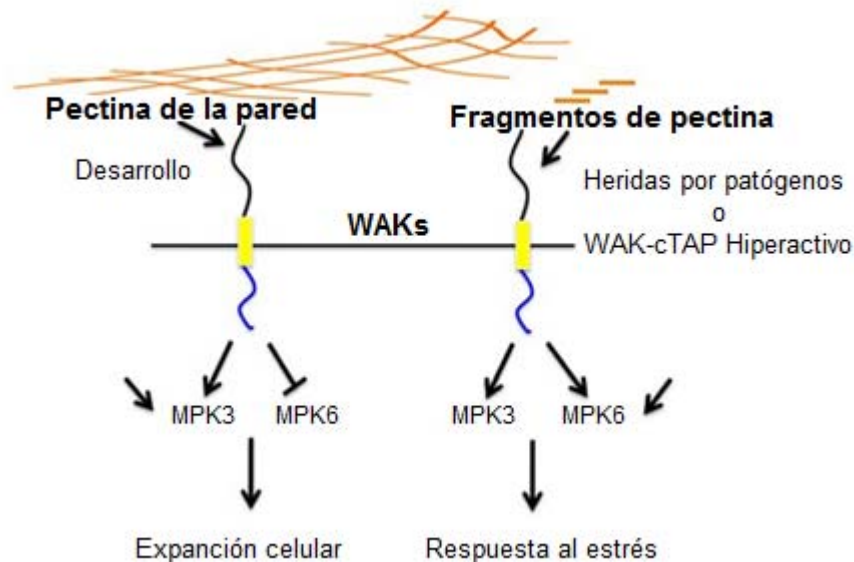
En la **Figura 11** se presentan los resultados de la actividad específica de la enzima  $\beta$ -1,3-glucanasa en tomate aplicado con los fragmentos de RG I, con respecto al tiempo de exposición. Se puede apreciar que los fragmentos no presentaron un efecto significativo en los niveles de actividad de la enzima durante la primera hora posterior a la aplicación. Sin embargo, a las 6 horas los fragmentos F-1 y F-2 indujeron un aumento significativo en el nivel de actividad enzimática, el cual fue 2 y 1.6 veces más, respectivamente con respecto al testigo. Posteriormente, el nivel de actividad disminuye sustancialmente y se mantiene constante hasta las 48 h. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos a las 24 y 48 h. La diferencia en la respuesta enzimática entre ambas fracciones a las 6 horas, no fue significativa debido a que las características y propiedades de los polímeros son similares, diferenciándose sólo en un bajo porcentaje de la polidispersidad (3.4%).



**Figura 11.** Actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa en frutos de tomate aplicados con dos fragmentos de RG I de papa (F-1 y F-2) durante 48 h a 20 °C y 85% H.R. Los superíndices indican diferencias significativas.

Evidencias científicas señalan el efecto inductor de fragmentos pécticos y derivados de RG I sobre la actividad enzimática de  $\beta$ -1,3-glucanasa en tejido vegetativo y células; sin embargo, hasta el momento no se han encontrado estudios científicos publicados en la literatura sobre el efecto inductor de RG I en esta enzima en frutos. Uno de los estudios realizados en plantas es el reportado por Boudart et al. (1998), quienes observaron un incremento de la  $\beta$ -1,3-glucanasa en plantas de frijol estimulada durante 48 horas por la aplicación de fragmentos pécticos. Los autores reportaron que esos fragmentos contenían mayor proporción de galactosa, arabinosa y ramnosa, sugiriendo la presencia de cadenas laterales en el RG I. Por otro lado, Dinand et al. (1997) aplicaron dos tetrasacáridos de RG I a células y protoplastos de *Rubus fruticosus* y encontraron un incremento en la actividad de esta enzima después de incubarlos por 15 minutos y 36 horas a una concentración de 30 nM. Los datos experimentales generados en este trabajo y los datos de la literatura

demuestran que los oligosacáridos derivados de RG I por acción de la ramnogalacturonano liasa pueden actuar como moléculas de señalización en plantas mediante la interacción con los receptores denominados WAKs (cinasas asociadas a la pared celular) que pueden unirse a pectinas, incluidos los homogalacturonanos, oligogalacturonidos y ramnogalacturonanos I y II (**Figura 12**) (Kohorn et al., 2009). La característica común de estas moléculas es la presencia de ácido galacturónico (AGal), por lo tanto la existencia de éste en las cadenas de los fragmentos pudo generar la señalización que provocó el aumento en la actividad enzimática de la  $\beta$ -1,3-glucanasa (Kohorn y Kohorn, 2012).



**Figura 12.** Modelo de la regulación de pectina-WAKs en respuesta al crecimiento y al estrés. La pectina en la pared celular y los fragmentos pécticos generados por algún estrés, activan los receptores WAKs en la membrana plasmática conduciendo a una respuesta dependiente del crecimiento o tipo de estrés (Kohorn y Kohorn, 2012).

Con respecto al tiempo en que se genera la respuesta, en el estudio realizado por Boudart et al. (1998), se demostró que la actividad de la  $\beta$ -1,3-glucanasa se indujo a partir de las 12 horas y disminuyó a las 48 horas del tratamiento con

fragmentos pécticos (en plantas de frijol resistentes). En un estudio reciente, se observó un aumento en la expresión relativa de genes de  $\beta$ -1,3-glucanasas en plántulas de lino infectadas con *Fusarium oxysporum*, incrementando la expresión del gen entre las 12 y 36 horas de la infección; además se pudo observar un cambio en la estructura de los polímeros de la pared celular (Wojtasik et al., 2016). En el presente estudio, la respuesta enzimática se generó a las 6 horas posteriores a la aplicación de los fragmentos, por lo que se sugiere que el tratamiento de frutos con los fragmentos F-1 y F-2 de RG I de papa al inducir la actividad de la  $\beta$ -1,3-glucanasa pueden inducir resistencia en el fruto antes de que ocurra una infección. Sin embargo, se requiere realizar estudios que permitan demostrar esta hipótesis de manera concluyente.

#### 6.2.2. Efecto de los Fragmentos de RG I en la Actividad Enzimática de la Quitinasa

Los niveles de la actividad específica de la quitinasa en los frutos de tomate, aplicados con los fragmentos de RG I se presentan en el **Cuadro 4**. Se puede apreciar que existe una actividad basal en los frutos testigo, con un nivel de actividad específica de 30.75 U/mg proteína. La aplicación de los fragmentos no indujo un aumento en los niveles de actividad enzimática, por lo que no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ).

**Cuadro 4.** Efecto de los fragmentos de RG I en la actividad específica de quitinasa en frutos de tomate.

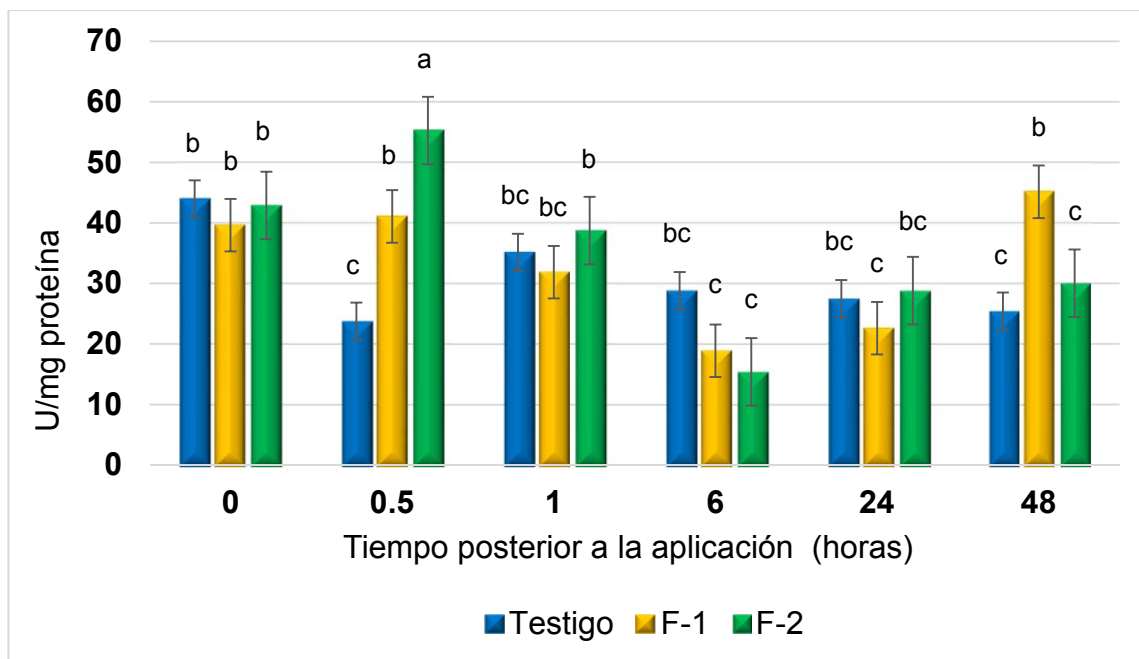
Tratamiento	Actividad Específica (U/mg proteína)
Testigo	30.75 $\pm$ 2.81
F-1 (12 h)	33.19 $\pm$ 2.66
F-2 (24 h)	35.17 $\pm$ 3.76

n=18.



En la **Figura 13** se muestran los resultados del efecto de la aplicación de los fragmentos de RG I en la actividad específica de quitinasa en los frutos de tomate con respecto al tiempo. Se puede observar que los frutos testigo presentaron una actividad basal de 30.75 U/mg proteína la cual fue disminuyendo con respecto al tiempo. Asimismo se puede apreciar que los fragmentos F-1 y F-2 indujeron un aumento de 1.2 y 2.3 veces respectivamente, los niveles de actividad enzimática a los 30 minutos con respecto al testigo. Posteriormente, hay un descenso en los niveles de actividad enzimática, no observándose diferencias significativas entre tratamientos.

La mayor inducción de la actividad de la quitinasa se presentó al aplicar F-2, lo cual puede ser debido a que este fragmento es el más bajo en el peso molecular, en la viscosidad y en el radio hidrodinámico (**Cuadro 1**), así como también a que su contenido de azúcares neutros y AGal es mayor (Ram 8%, Gal 13% y AGal 45%). El tipo de azúcares y su arreglo estructural podrían ser los que causan la interacción con los receptores WAKs que envían la señal al interaccionar con el oligosacárido (Kohorn y Kohorn, 2012). Se ha demostrado que los fragmentos pépticos con características de RG I inducen la actividad de la quitinasa en tejido vegetativo (Dinand et al., 1997; Boudart et al., 1998). Sin embargo, hasta el momento no se han encontrado estudios científicos publicados en frutos, por lo que los resultados del presente estudio son las primeras evidencias experimentales que demuestran que los fragmentos del RG I de papa también inducen la actividad de la quitinasa en frutos.



**Figura 13.** Actividad de quitinasa en frutos de tomate tratados con dos fragmentos de RG I de papa (F-1 y F-2) durante 48 h a 20 °C y 85% H.R. Los superíndices indican diferencias significativas.

Shinya et al. (2006) demostraron que la laminarina y los  $\beta$ -glucanos actúan como elicitores de esta enzima y de la fenilalanina amonioliasa, que es una enzima importante en la ruta de los fenilpropanoides, en células de tabaco después de 3 horas del tratamiento inductor. Los  $\beta$ -glucanos fueron aplicados a una concentración baja (50  $\mu$ g/mL) con un peso molecular mayor a 4 kDa y conformado principalmente de glucosa; estas características son similares a F-2, donde el peso molecular es el más bajo de las fracciones (16 kDa) pero está conformado principalmente de AGal y galactosa, y fue aplicado a una concentración de 30  $\mu$ M. Es posible sugerir que la composición y conformación de los oligosacáridos generados en el presente trabajo es la razón por la cual se genera la activación de la enzima quitinasa a la media hora del tratamiento.

El estudio de la expresión del gen de la enzima quitinasa ha indicado que se expresa antes que la  $\beta$ -1,3-glucanasa, durante las primeras horas con un elicitador péptico de RG I de tejido vegetativo de frijol (Boudart et al., 1998).

Asimismo, que los receptores WAKs (específicamente WAK 1 y 2, cinasas asociadas a la pared celular, relacionadas con la señalización) son regulados a partir de 1 hasta 3 horas después del tratamiento con oligogalacturónidos indicando la naturaleza transitoria de una respuesta temprana (Denoux et al., 2008; Trouvelot et al., 2014). Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los reportados por esos autores, ya que la quitinasa se indujo a las 0.5 horas y la  $\beta$ -1,3-glucanasa se indujo hasta las 6 horas con el fragmento F-2 (**Figura 11 y 13**). Se ha sugerido que los receptores mencionados anteriormente se unen a la pectina formando un enlace no covalente con un fragmento péctico (Wagner y Kohorn, 2001; Kohorn y Kohorn, 2012). Además, los residuos pécticos unidos a los receptores WAK 1 y 2 cargados positivamente pueden unirse más fácilmente a pectinas desesterificadas, por su contenido de cargas negativas, por lo que la interacción se realiza muy probablemente mediante enlaces electrostáticos (Decreux et al., 2006).

En el presente estudio se puede observar que de acuerdo al espectro de FTIR, los fragmentos F-1 y F-2 aumentan la señal de la banda de los grupos carboxilos esterificados (**Figura 8**), por lo que su unión a la pectina en la pared celular del fruto, puede dificultarse por la falta de cargas negativas en los fragmentos. Es posible que debido a esto, la actividad de la quitinasa disminuye con respecto al tiempo de exposición.

### **6.2.3. Efecto de los Fragmentos de RG I en la Actividad Enzimática de la Peroxidasa**

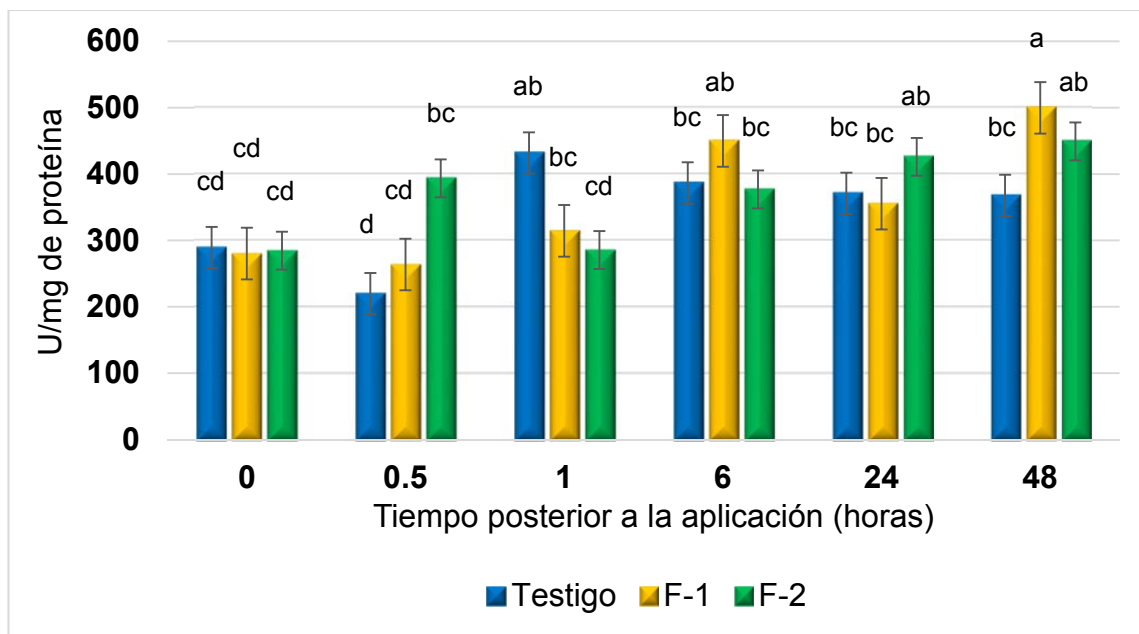
En el **Cuadro 5** se presentan los resultados de la actividad específica de la peroxidasa en tomate aplicados con fragmentos de RG I. Los frutos testigo presentaron una actividad basal de 344.31 U/mg de proteína, la cual no fue afectada por la aplicación de los fragmentos ( $P>0.5$ ). Se muestra que los tratamientos no generaron un cambio en la actividad enzimática de la peroxidasa ( $P>0.5$ ).

**Cuadro 5.** Actividad específica de la peroxidasa en tomates tratados con fragmentos de RG I.

<b>Tratamiento</b>	<b>Actividad Específica (U/mg de proteína)</b>
<b>Testigo</b>	344.32 ± 19.28
<b>Fracción 1 (12 h)</b>	360.53 ± 26.19
<b>Fracción 2 (24 h)</b>	369.23 ± 19.21

n=18.

En la **Figura 14** se presentan los resultados del efecto de los fragmentos de RG I sobre la actividad enzimática de la peroxidasa con respecto al tiempo de exposición. La interacción tratamiento vs tiempo fue significativa, observándose que los fragmentos de RG I indujeron un aumento en los niveles de actividad enzimática. La aplicación del fragmento F-2 indujo un aumento en el nivel de actividad de esta enzima de 1.8 veces con respecto al testigo, a los 30 minutos después de la aplicación. Posteriormente se aprecia una fluctuación en los niveles de actividad en todos los tratamientos. El nivel más alto de la actividad de la peroxidasa se registró a las 48 horas en los frutos de tomate tratados con F-1 y F-2, con 499.74 y 449.2 U/mg de proteína, respectivamente. Estos niveles de actividad enzimática fueron iguales estadísticamente a los registrados en los frutos tratados con F-1 por 6 horas y con F-2 por 24 horas.



**Figura 14.** Actividad de peroxidasa en frutos de tomate tratados con dos fragmentos de RG I de papa (F-1 y F-2) durante 48 h a 20 °C y 85% H.R. Los superíndices indican diferencias significativas.

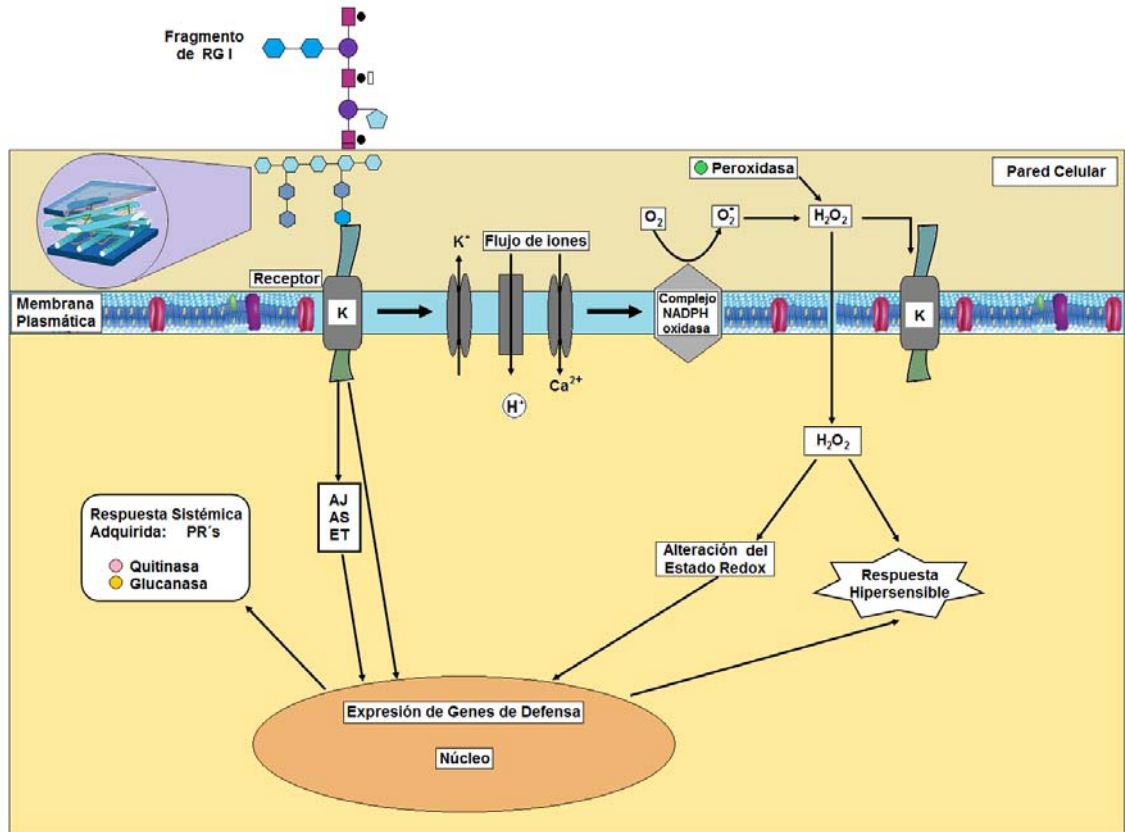
Las especies reactivas de oxígeno (ERO) tales como el  $H_2O_2$ , superóxido y radical hidroxilo pueden ser generados por distintos tipos de estrés y estas a su vez son reguladas por enzimas que protegen a las diferentes estructuras de las células vegetales de daños oxidativos (Wang, 1995; Trouvelot et al., 2014). En plantas se ha demostrado el efecto de fragmentos pécticos en la activación del mecanismo de defensa. En tomate fue aplicada una solución de oligogalacturónidos, los cuales indujeron un incremento sustancial de especies reactivas de oxígeno (ERO), la activación de proteínas relacionadas a la patogénesis (PRs) y el cierre de estomas (Ridley et al., 2001; Trouvelot et al., 2014). También se observó una producción de ERO en  $H_2O_2$ , como respuesta de defensa en tabaco tratado con  $\beta$ -glucanos, en donde se observó un aumento en la producción desde la media hora hasta las 6 horas de la inducción (Shinya et al., 2006). En el caso particular del efecto inductor de fragmentos pécticos en frutos, la información científica publicada hasta el momento es escasa. Uno de los estudios publicados es el reportado por Osorio et al. (2011), quienes

evaluaron el efecto de oligogalaturónidos parcialmente desmetilados en el desarrollo del fruto de fresa y en el mecanismo de defensa. Los autores reportaron una sobreexpresión de diversos genes de defensa en los frutos aplicados, entre los cuales la peroxidasa presentó una sobreexpresión de 7.6 veces.

La aplicación de F-2 de RG I de papa indujo un incremento en el nivel de actividad de peroxidasa en tomate, a la media hora de exposición, así como a las 24 y 48 horas; con F-1 la inducción se llevó a cabo a las 6 y 48 horas. Estas diferencias en los niveles de la peroxidasa con respecto al tiempo se pueden deber a los diferentes pesos moleculares de los fragmentos y propiedades estructurales mencionadas anteriormente. Por otro lado, se muestra que la actividad de la peroxidasa se incrementa con respecto al tiempo, lo que es de esperarse debido a la maduración del fruto y a la actividad transitoria que se genera por la estimulación péctica del receptor WAK 2 (quinasa de la pared celular). Este receptor tiene un alelo dominante que se mantiene activo, manifestando todas las características del efecto de un patógeno pero en ausencia de él, por lo tanto los oligosacáridos provocan la acumulación de EROs y la activación de enzimas oxidativas como la peroxidasa (Kohorn et al., 2009; Kohorn y Kohorn, 2012).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, el fragmento que indujo un mayor nivel de actividad enzimática fue el F-2 (fragmento con 24 horas de hidrólisis con la RG liasa), lo cual pudo ser debido a sus características y propiedades estructurales. Este fragmento presentó más cambios con respecto al RG I de papa s/f, particularmente en su composición de azúcares neutros de los cuales la galactosa fue el predominante, lo cual puede sugerir que hubo una mayor interacción con los receptores relacionados con la pared celular del tomate provocando un aumento en la actividad de las enzimas de defensa. Sin embargo, es necesario realizar más estudios que permitan comprobar esa hipótesis.

En la **Figura 15** se propone un modelo con el cual se pretende explicar el efecto inductor de los fragmentos de RG I en frutos de tomate. Es posible que debido a las características y propiedades estructurales de estos fragmentos, son reconocidos por receptores transmembranales (WAKs) que están unidos a fragmentos de pectina de la pared celular vegetal. Posiblemente esta pectina se une a los fragmentos de RG I que actúan como elicitores, desencadenando una cascada de señalización y la producción de especies reactivas de oxígeno en donde éstas provocan una primera acción de las enzimas peroxidasas. Asimismo, la cascada de señalización puede llevarse a cabo mediante moléculas como el ácido jasmónico, ácido salicílico o etileno (AJ, AS, ET) o también por otras rutas, generando la expresión de genes de defensa que sintetizan enzimas relacionadas a la patogénesis como las  $\beta$ -1,3-glucanasas, quitinasas y peroxidasas. Sin embargo, hacen falta estudios que ayuden a entender el papel que juegan los fragmentos de RG I como elicitores en la célula vegetal de frutos, en el cual se ven involucrados diversos mecanismos de acción. Los resultados en el presente trabajo aportan datos importantes acerca del mecanismo de defensa en frutos de tomate con el RG I de papa como elicitador, así como también se dan a conocer algunas características estructurales de fragmentos de RG I de papa obtenidos por la acción de la enzima RG liasa.



**Figura 15.** Modelo propuesto del efecto elicitor de los fragmentos de RG I en frutos de tomate. Los fragmentos de RG I de papa se unen a fragmentos pécticos de la pared celular vegetal, los cuales están unidos a receptores cinasas transmembranales (K) que a su vez desencadenan una cascada de señalización y la producción de especies reactivas de oxígeno. La cascada de señalización puede seguir diversas rutas, unas de ellas por moléculas como el ácido jasmónico, ácido salicílico o etileno (AJ, AS, ET); generando así la expresión de genes de defensa que pueden llevar a una respuesta hipersensible o a una respuesta sistémica adquirida.



## VII. CONCLUSIÓN

Los fragmentos de ramnogalacturonano I de papa producidos por la degradación de la enzima RG Liasa, con pesos de 20 y 16 kDa y una viscosidad intrínseca promedio en peso de 27 y 26 mL/g respectivamente, incrementaron los niveles de la actividad de las enzimas  $\beta$ -1,3-glucanasa, quitinasa y peroxidasa en frutos de tomate.

## VIII. RECOMENDACIONES

- ❖ Realizar una purificación y una caracterización más completa del RG I y sus fragmentos.
- ❖ Determinar el efecto elicitor de los fragmentos de RG I en otras enzimas como la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL) y compuestos fenólicos en frutos de tomate.
- ❖ Determinar el efecto elicitor de los fragmentos de RG I en frutos de tomate infectados con algún hongo fitopatógeno.
- ❖ Analizar la expresión de genes de defensa relacionados con los receptores cinasas.

## IX. REFERENCIAS

- Abeles, F. 1970. Temporal and hormonal control of  $\alpha$ -1, 3-Glucanase in *Phaseolus vulgaris* L. . Plant Physiol. 45: 395-400.
- Acuña, A. M. and Molina, P. E. C. 2007. Desempeño funcional del boro en las plantas. Revista Científica UDO Agrícola. 7(1): 1-14.
- Alam, M., Rahman, M. H., Mamun, M., Ahmad, I. and Islam, K. 2006. Enzyme activities in relation to sugar accumulation in tomato. Proceedings-Pakistan Academy of Sciences. 43(4): 241.
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R. and Staehelin, A. 2010. Principles of cell wall architecture and assembly. Garland Science. New York. 227-272.
- Almeida, I. P. and Carpita, N. 2006. Las B-galactosidasas y la dinámica de la pared celular. Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América. 31(7): 476-483.
- Beerhues, L. and Kombrink, E. 1994. Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase and 1, 3- $\beta$ -glucanase in potato. Plant molecular biology. 24(2): 353-367.
- Blakeney, A. B., Harris, P. J., Henry, R. J. and Stone, B. A. 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. Carbohydr Res. 113(2): 291-299.
- Boller, T. and Felix, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. Annual review of plant biology. 60: 379-406.
- Boudart, G., Charpentier, M., Lafitte, C., Martinez, Y., Jauneau, A., Gaulin, E., Esquerré-Tugayé, M.-T. and Dumas, B. 2003. Elicitor activity of a fungal endopolygalacturonase in tobacco requires a functional catalytic site and cell wall localization. Plant physiology. 131(1): 93-101.

- Boudart, G., Lafitte, C., Barthe, J. P., Frasez, D. and Esquerré-Tugayé, M.-T. 1998. Differential elicitation of defense responses by pectic fragments in bean seedlings. *Planta*. 206(1): 86-94.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72(1-2): 248-254.
- Brown, R. M. 2004. Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 42(3): 487-495.
- Burton, R. A., Gidley, M. J. and Fincher, G. B. 2010. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature chemical biology*. 6(10): 724-732.
- Bush, M. S., Marry, M., Huxham, M. I., Jarvis, M. C. and McCann, M. C. 2001. Developmental regulation of pectic epitopes during potato tuberisation. *Planta*. 213(6): 869-880.
- Byg, I., Diaz, J., Ogendal, L. H., Harholt, J., Jorgensen, B., Rolin, C., Svava, R. and Ulvskov, P. 2012. Large-scale extraction of rhamnogalacturonan I from industrial potato waste. *Food chemistry*. 131(4): 1207-1216.
- Cabrera, J. C., Boland, A., Messiaen, J., Cambier, P. and Van Cutsem, P. 2008. Egg box conformation of oligogalacturonides: the time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. *Glycobiology*. 18(6): 473-482.
- Caffall, K. H. and Mohnen, D. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr Res*. 344(14): 1879-1900.
- Cárdenas-Coronel, W. G., Velez-de la Rocha, R., Siller-Cepeda, J. H., Osuna-Enciso, T., Muy-Rangel, M. D. and Sañudo-Barajas, J. A. 2012. Cambios en la composición de almidón, pectinas y hemicelulosas durante la maduración de mango (*Mangifera indica* cv. Kent). *Revista Chapingo. Serie horticultura*. 18(1): 05-19.
- Carpita, N. C. 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual review of plant biology*. 47(1): 445-476.

- Carpita, N. C. and Gibeaut, D. M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*. 3(1): 1-30.
- Carvajal-Millan, E., Landillon, V., Morel, M.-H., Rouau, X., Doublier, J.-L. and Micard, V. 2005. Arabinoxylan gels: Impact of the feruloylation degree on their structure and properties. *Biomacromolecules*. 6(1): 309-317.
- Cosgrove, D. J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature reviews molecular cell biology*. 6(11): 850-861.
- Cota, I., Troncoso-Rojas, R., Sotelo-Mundo, R., Sánchez-Estrada, A. and Tiznado-Hernández, M. 2007. Chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. *Scientia Horticulturae*. 112(1): 42-50.
- Côté, F. and Hahn, M. 1994. Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Signals and Signal Transduction Pathways in Plants*. Springer Netherlands. K. Palme. 143-175.
- Chaplin, M. 1986. Monosaccharides. *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*. M. K. Chaplin, JF Oxford, England. 1-36.
- Decreux, A., Thomas, A., Spies, B., Brasseur, R., Van Cutsem, P. and Messiaen, J. 2006. In vitro characterization of the homogalacturonan-binding domain of the wall-associated kinase WAK1 using site-directed mutagenesis. *Phytochemistry*. 67(11): 1068-1079.
- Delaunois, B., Farace, G., Jeandet, P., Clément, C., Baillieul, F., Dorey, S. and Cordelier, S. 2014. Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environmental Science and Pollution Research*. 21(7): 4837-4846.
- Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F. M. and Dewdney, J. 2008. Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Molecular plant*. 1(3): 423-445.
- Di Pietro, A. and Roncero, M. I. G. 2004. Temas de actualidad. *Fusarium oxysporum*: un modelo para el análisis de la patogénesis fúngica en plantas y humanos.

- Dinand, E., Excoffier, G., Lienart, Y. and Vignon, M. R. 1997. Two rhamnogalacturonide tetrasaccharides isolated from semi-retted flax fibers are signaling molecules in *Rubus fruticosus* L. cells. *Plant physiology*. 115(2): 793-801.
- Dixon, R. A. and Lamb, C. J. 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual review of plant biology*. 41(1): 339-367.
- Duan, J., Wang, X., Dong, Q., Fang, J.-n. and Li, X. 2003. Structural features of a pectic arabinogalactan with immunological activity from the leaves of *Diospyros kaki*. *Carbohydr Res*. 338(12): 1291-1297.
- Ehwald, R., Woehlecke, H. and Titel, C. 1992. Cell wall microcapsules with different porosity from suspension cultured *Chenopodium album*. *Phytochemistry*. 31(9): 3033-3038.
- Enríquez-Guevara, E. A., Aispuro-Hernández, E., Vargas-Arispuro, I. and Martínez-Téllez, M. Á. 2010. Oligosacarinas Derivadas de Pared Celular: Actividad Biológica y Participación en la Respuesta de Defensa de Plantas. *Revista mexicana de fitopatología*. 28(2): 144-155.
- Esquinas-Alcázar, J. T. and Nuez, F. V. 1995. *El Cultivo Del Tomate*. Ediciones Mundi-Prensa. España. 29, 69-73, 159-163.
- FAO. 2014. Producción/cultivos/Tomate. 2016, from <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>.
- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F. M. and Dewdney, J. 2007. Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant physiology*. 144(1): 367-379.
- Ferrari, S., Savatin, D. V., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F. and De Lorenzo, G. 2013. Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in plant science*. 4.
- Flurkey, W. H. and Jen, J. J. 1978. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *Journal of Food Science*. 43(6): 1826-1828.
- Fry, S. C. 2004. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New phytologist*. 161(3): 641-675.

- Fu, Y., Yin, H., Wang, W., Wang, M., Zhang, H., Zhao, X. and Du, Y. 2011.  $\beta$ -1, 3-Glucan with different degree of polymerization induced different defense responses in tobacco. *Carbohydrate Polymers*. 86(2): 774-782.
- Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, F. M., De Lorenzo, G. and Ferrari, S. 2008. The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in *Arabidopsis* is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant physiology*. 148(3): 1695-1706.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D. and Pugin, A. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 19(7): 711-724.
- Gnanasambandam, R. and Proctor, A. 2000. Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food chemistry*. 68(3): 327-332.
- Goh, K. K., Pinder, D. N., Hall, C. E. and Hemar, Y. 2006. Rheological and light scattering properties of flaxseed polysaccharide aqueous solutions. *Biomacromolecules*. 7(11): 3098-3103.
- González-Estrada, R., Calderón-Santoyo, M., Carvajal-Millan, E., Valle, F. d. J. A., Ragazzo-Sánchez, J. A., Brown-Bojorquez, F. and Rascón-Chu, A. 2015. Covalently cross-linked arabinoxylans films for *Debaryomyces hansenii* entrapment. *Molecules*. 20(6): 11373-11386.
- Gou, J.-Y., Miller, L. M., Hou, G., Yu, X.-H., Chen, X.-Y. and Liu, C.-J. 2012. Acetyltransferase-mediated deacetylation of pectin impairs cell elongation, pollen germination, and plant reproduction. *The Plant Cell Online*. 24(1): 50-65.
- Grierson, D. and Kader, A. 1986. Fruit ripening and quality. *The tomato crop*. Springer. 241-280.
- Gust, A. A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H. M. and Nürnberger, T. 2012. Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends in plant science*. 17(8): 495-502.
- Hahn, M. G., Darvill, A. G. and Albersheim, P. 1981. Host-pathogen interactions XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant physiology*. 68(5): 1161-1169.

- Hamann, T. 2012. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Frontiers in plant science*. 3.
- Hamann, T., Bennett, M., Mansfield, J. and Somerville, C. 2009. Identification of cell-wall stress as a hexose-dependent and osmosensitive regulator of plant responses. *The Plant Journal*. 57(6): 1015-1026.
- Haswell, E. S., Peyronnet, R., Barbier-Brygoo, H., Meyerowitz, E. M. and Frachisse, J.-M. 2008. Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the Arabidopsis root. *Current Biology*. 18(10): 730-734.
- Hématy, K., Cherk, C. and Somerville, S. 2009. Host–pathogen warfare at the plant cell wall. *Current opinion in plant biology*. 12(4): 406-413.
- Hoffmann-Sommergruber, K. 2002. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochemical Society Transactions*. 30(6): 930-935.
- Hu, H. and Brown, P. H. 1994. Localization of boron in cell walls of squash and tobacco and its association with pectin (evidence for a structural role of boron in the cell wall). *Plant physiology*. 105(2): 681-689.
- Huisman, M. M., Brüll, L. P., Thomas-Oates, J. E., Haverkamp, J., Schols, H. A. and Voragen, A. G. 2001. The occurrence of internal (1→5)-linked arabinofuranose and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectic substances. *Carbohydr Res*. 330(1): 103-114.
- Hurlbert, J. C. and Preston, J. F. 2001. Functional characterization of a novel xylanase from a corn strain of *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of bacteriology*. 183(6): 2093-2100.
- Hwang, B. K., Sunwoo, J. Y., Kim, Y. J. and Kim, B. S. 1997. Accumulation of  $\beta$ -1, 3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- $\beta$ -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 51(5): 305-322.
- Ishii, T. and Matsunaga, T. 2001. Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry*. 57(6): 969-974.



- Juárez-Becerra, G., Sosa-Morales, M. and López-Malo, A. 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 4(2): 14-23.
- Kacurakova, M., Capek, P., Sasinkova, V., Wellner, N. and Ebringerova, A. 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*. 43(2): 195-203.
- Kandekar, U. Y., Chaudhari, P. D. and Chandrasekhar, K. 2015. Isolation and evaluation of mucilage from *Linum usitatissimum* seeds. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology and Innovation* ISSN. 2347: 8810.
- Khodaei, N. and Karboune, S. 2013. Extraction and structural characterisation of rhamnogalacturonan I-type pectic polysaccharides from potato cell wall. *Food chemistry*. 139(1): 617-623.
- Kohorn, B. D., Johansen, S., Shishido, A., Todorova, T., Martinez, R., Defeo, E. and Obregon, P. 2009. Pectin activation of MAP kinase and gene expression is WAK2 dependent. *The Plant Journal*. 60(6): 974-982.
- Kohorn, B. D. and Kohorn, S. L. 2012. The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors. *Frontiers in plant science*. 3: 88.
- Kravtchenko, T., Arnould, I., Voragen, A. and Pilnik, W. 1992. Improvement of the selective depolymerization of pectic substances by chemical  $\beta$ -elimination in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*. 19(4): 237-242.
- Lamikanra, O. 1995. Enzymatic browning of muscadine grape products. *Enzymatic Browning and its Prevention Symposium Series* 600. .
- Lau, J. M., McNeil, M., Davill, A. G. and Albersheim, P. 1985. Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydr Res*. 137: 111-125.
- Limberg, G., Körner, R., Buchholt, H. C., Christensen, T. M., Roepstorff, P. and Mikkelsen, J. D. 2000. Analysis of different de-esterification mechanisms for pectin by enzymatic fingerprinting using endopectin lyase and endopolygalacturonase II from *A. niger*. *Carbohydr Res*. 327(3): 293-307.
- Liners, F., Letesson, J.-J., Didembourg, C. and Van Cutsem, P. 1989. Monoclonal antibodies against pectin recognition of a conformation induced by calcium. *Plant physiology*. 91(4): 1419-1424.

- Lionetti, V., Cervone, F. and Bellincampi, D. 2012. Methyl esterification of pectin plays a role during plant-pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. *Journal of plant physiology*. 169(16): 1623-1630.
- Lodish, H. 2005. *Biología celular y molecular*. Ed. Médica Panamericana. Quinta edición. 231-232, 173-177, 779-848.
- Macho, A. P. and Zipfel, C. 2014. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular cell*. 54(2): 263-272.
- Martín-Hernández, S., Ordaz-Chaparro, V. M., Sánchez-García, P., Colinas-Leon, B., María, T. and Borges-Gómez, L. 2012. Calidad de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) producido en hidroponía con diferentes granulometrías de tezontle. *Agrociencia*. 46(3): 243-254.
- Marty, P., Jouan, B., Bertheau, Y., Vian, B. and Goldberg, R. 1997. Charge density in stem cell walls of *Solanum tuberosum* genotypes and susceptibility to blackleg. *Phytochemistry*. 44(8): 1435-1441.
- McDonough, M. A., Kadirvelraj, R., Harris, P., Poulsen, J.-C. N. and Larsen, S. 2004. Rhamnogalacturonan lyase reveals a unique three-domain modular structure for polysaccharide lyase family 4. *FEBS letters*. 565(1): 188-194.
- Mckie, V. A., Vincken, J.-P., Voragen, A. G., Van den Broek, L. A., Stimson, E. and Gilbert, H. J. 2001. A new family of rhamnogalacturonan lyases contains an enzyme that binds to cellulose. *Biochemical Journal*. 355(1): 167-177.
- McMillan, G., Hedley, D., Fyffe, L. and Pérombelon, M. 1993. Potato resistance to soft-rot erwinias is related to cell wall pectin esterification. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 42(4): 279-289.
- Mercier, J., Roussel, D., Charles, M.-T. and Arul, J. 2000. Systemic and local responses associated with UV-and pathogen-induced resistance to *Botrytis cinerea* in stored carrot. *Phytopathology*. 90(9): 981-986.
- Micheli, F. 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in plant science*. 6(9): 414-419.
- Mohnen, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*. 11(3): 266-277.

- Morris, G. A., de al Torre, J. G., Ortega, A., Castile, J., Smith, A. and Harding, S. E. 2008. Molecular flexibility of citrus pectins by combined sedimentation and viscosity analysis. *Food Hydrocolloids*. 22(8): 1435-1442.
- Morris, G. A., Ralet, M.-C., Bonnin, E., Thibault, J.-F. and Harding, S. E. 2010. Physical characterisation of the rhamnogalacturonan and homogalacturonan fractions of sugar beet (*Beta vulgaris*) pectin. *Carbohydrate Polymers*. 82(4): 1161-1167.
- Nakamura, A., Furuta, H., Maeda, H., Takao, T. and Nagamatsu, Y. 2002. Structural studies by stepwise enzymatic degradation of the main backbone of soybean soluble polysaccharides consisting of galacturonan and rhamnogalacturonan. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 66(6): 1301-1313.
- Naran, R., Pierce, M. L. and Mort, A. J. 2007. Detection and identification of rhamnogalacturonan lyase activity in intercellular spaces of expanding cotton cotyledons. *The Plant Journal*. 50(1): 95-107.
- Nothnagel, E. A., McNeil, M., Albersheim, P. and Dell, A. 1983. Host-pathogen interactions XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins. *Plant physiology*. 71(4): 916-926.
- O'Neill, M. A., Ishii, T., Albersheim, P. and Darvill, A. G. 2004. Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 109-139.
- O'Neill, M. A. and York, W. S. 2003. The composition and structure of plant primary cell walls. *The plant cell wall*: 1-54.
- Obro, J., Harholt, J., Scheller, H. V. and Orfila, C. 2004. Rhamnogalacturonan I in *Solanum tuberosum* tubers contains complex arabinogalactan structures. *Phytochemistry*. 65(10): 1429-1438.
- Ochiai, A., Yamasaki, M., Itoh, T., Mikami, B., Hashimoto, W. and Murata, K. 2006. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the rhamnogalacturonan lyase YesW from *Bacillus subtilis* strain 168, a member of polysaccharide lyase family 11. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*. 62(5): 438-440.
- Ojha, S. and Chatterjee, N. 2012. Induction of resistance in tomato plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici mediated through salicylic

acid and *Trichoderma harzianum*. Journal of Plant Protection Research. 52(2): 220-225.

Okinaka, Y., Mimori, K., Takeo, K., Kitamura, S., Takeuchi, Y., Yamaoka, N. and Yoshikawa, M. 1995. A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant [beta]-1, 3-endoglucanase. Plant physiology. 109(3): 839-845.

Oosterveld, A., Beldman, G. and Voragen, A. G. 2002. Enzymatic modification of pectic polysaccharides obtained from sugar beet pulp. Carbohydrate Polymers. 48(1): 73-81.

Osorio, S., Alba, R., Damasceno, C. M., Lopez-Casado, G., Lohse, M., Zanon, M. I., Tohge, T., Usadel, B., Rose, J. K. and Fei, Z. 2011. Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (*nor*, *rin*) and ethylene receptor (*Nr*) mutants reveals novel regulatory interactions. Plant physiology. 157(1): 405-425.

Osorio, S., Castillejo, C., Quesada, M. A., Medina-Escobar, N., Brownsey, G. J., Suau, R., Heredia, A., Botella, M. A. and Valpuesta, V. 2008. Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). The Plant Journal. 54(1): 43-55.

Pagel, W. and Heitefuss, R. 1990. Enzyme activities in soft rot pathogenesis of potato tubers: effects of calcium, pH, and degree of pectin esterification on the activities of polygalacturonase and pectate lyase. Physiological and Molecular Plant Pathology. 37(1): 9-25.

Pelloux, J., Rusterucci, C. and Mellerowicz, E. J. 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. Trends in plant science. 12(6): 267-277.

Pérez-Almeida, I. and Carpita, N. C. 2006. Las  $\beta$ -galactosidasas y la dinámica de la pared celular. Interciencia. 31(7): 476-483.

Persson, S., Caffall, K. H., Freshour, G., Hilley, M. T., Bauer, S., Poindexter, P., Hahn, M. G., Mohnen, D. and Somerville, C. 2007. The Arabidopsis irregular xylem8 mutant is deficient in glucuronoxylan and homogalacturonan, which are essential for secondary cell wall integrity. The Plant Cell Online. 19(1): 237-255.

- Pogorelko, G., Lionetti, V., Fursova, O., Sundaram, R. M., Qi, M., Whitham, S. A., Bogdanove, A. J., Bellincampi, D. and Zabolina, O. A. 2013. *Arabidopsis* and *Brachypodium distachyon* transgenic plants expressing *Aspergillus nidulans* acetyltransferases have decreased degree of polysaccharide acetylation and increased resistance to pathogens. *Plant physiology*. 162(1): 9-23.
- Popper, Z. A. and Fry, S. C. 2008. Xyloglucan-pectin linkages are formed intraprotoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall. *Planta*. 227(4): 781-794.
- Pradeep, T. and Jambhale, N. 2002. Relationship between phenolics, polyphenol oxidase and peroxidases and resistance to powdery mildew in *Zizyphus*. *Indian Phytopathology*. 55(2): 195-196.
- Raiola, A., Lionetti, V., Elmaghraby, I., Immerzeel, P., Mellerowicz, E. J., Salvi, G., Cervone, F. and Bellincampi, D. 2011. Pectin methylesterase is induced in *Arabidopsis* upon infection and is necessary for a successful colonization by necrotrophic pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24(4): 432-440.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A. and Mohnen, D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. 57(6): 929-967.
- Robertsen, B. 1986. Elicitors of the production of lignin-like compounds in cucumber hypocotyls. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 28(1): 137-148.
- Sakamoto, T. and Sakai, T. 1995. Analysis of structure of sugar-beet pectin by enzymatic methods. *Phytochemistry*. 39(4): 821-823.
- Sánchez-Estrada, A., Tiznado-Hernández, M. E., Ojeda-Contreras, A. J., Valenzuela-Quintanar, A. I. and Troncoso-Rojas, R. 2009. Induction of enzymes and phenolic compounds related to the natural defence response of netted melon fruit by a bio-elicitor. *Journal of phytopathology*. 157(1): 24-32.
- Scheller, H. V. and Ulvskov, P. 2010. Hemicelluloses. *Plant Biology*. 61(1): 263.
- Sela-Buurlage, M. B., Ponstein, A. S., Bres-Vloemans, S. A., Melchers, L. S., van den Elzen, P. J. and Cornelissen, B. J. 1993. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and [beta]-1, 3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant physiology*. 101(3): 857-863.

- Selvendran, R. R. 1987. Chemistry of plant cell walls and dietary fibre. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 22(S129): 33-41.
- Sénéchal, F., Wattier, C., Rustérucchi, C. and Pelloux, J. 2014. Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants. *Journal of Experimental Botany*: eru272.
- Seymour, G. B., Colquhoun, I. J., Dupont, M. S., Parsley, K. R. and Selvendran, R. R. 1990. Composition and structural features of cell wall polysaccharides from tomato fruits. *Phytochemistry*. 29(3): 725-731.
- Shinya, T., Menard, R., Kozone, I., Matsuoka, H., Shibuya, N., Kauffmann, S., Matsuoka, K. and Saito, M. 2006. Novel  $\beta$ -1, 3-, 1, 6-oligoglucan elicitor from *Alternaria alternata* 102 for defense responses in tobacco. *Febs Journal*. 273(11): 2421-2431.
- Shiu, S.-H. and Bleecker, A. B. 2003. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant physiology*. 132(2): 530-543.
- Silva, I. R., Jers, C., Meyer, A. S. and Mikkelsen, J. D. 2016. Rhamnogalacturonan I modifying enzymes: an update. *New biotechnology*. 33(1): 41-54.
- Simpson, S., Ashford, D., Harvey, D. and Bowles, D. 1998. Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants. *Glycobiology*. 8(6): 579-583.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredes, A., Persson, S. and Raab, T. 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*. 306(5705): 2206-2211.
- Sousa, A. G., Nielsen, H. L., Armagan, I., Larsen, J. and Sørensen, S. O. 2015. The impact of rhamnogalacturonan-I side chain monosaccharides on the rheological properties of citrus pectin. *Food Hydrocolloids*. 47: 130-139.
- Taylor, K. A. 1993. A colorimetric method for the quantitation of galacturonic acid. *Applied biochemistry and biotechnology*. 43(1): 51-54.
- Taylor, K. A. and Buchanan-Smith, J. G. 1992. A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid. *Analytical biochemistry*. 201(1): 190-196.

- Thanseem, I., Joseph, A. and Thulaseedharan, A. 2005. Induction and differential expression of  $\beta$ -1, 3-glucanase mRNAs in tolerant and susceptible *Hevea* clones in response to infection by *Phytophthora meadii*. *Tree physiology*. 25(11): 1361-1368.
- Tripathi, P. and Dubey, N. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest biology and Technology*. 32(3): 235-245.
- Trouvelot, S., Héloir, M.-C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., Combier, M., Tdra, L., Daire, X. and Adrian, M. 2014. Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in plant science*.
- Trouvelot, S., Héloir, M.-C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., Combier, M., Trdá, L., Daire, X. and Adrian, M. 2014. Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in plant science*. 5.
- Underwood, W. 2012. The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in plant science*. 3.
- Urias-Orona, V., Huerta-Oros, J., Carvajal-Millán, E., Lizardi-Mendoza, J., Rascón-Chu, A. and Gardea, A. A. 2010. Component analysis and free radicals scavenging activity of *Cicer arietinum* L. husk pectin. *Molecules*. 15(10): 6948-6955.
- Urrestarazu G., M. 2004. Producción y Calidad en el Cultivo de Tomate Cherry. Tratado de cultivo sin suelo. E. Mundi-Prensa. Tercera Edición. Madrid, España. 1, 703-748.
- Van Loon, L. and Van Kammen, A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN': II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*. 40(2): 199-211.
- Van Loon, L. and Van Strien, E. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 55(2): 85-97.
- Van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T. and Conejero, V. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*. 12(3): 245-264.

- Van Loon, L. C., Rep, M. and Pieterse, C. M. J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135-162.
- Vidhyasekaran, P. 2007. Induction and evasion of pathogenesis-related proteins. *Fungal pathogenesis in plants and crops: molecular biology and host defense mechanisms.* CRC Press. USA. 345-409.
- Vidhyasekaran, P. 2008. Fungal pathogenesis in plants and crops: molecular biology and host defense mechanisms. Induction and evasion of pathogenesis-related proteins. USA. 345-409.
- Vincken, J.-P., Schols, H. A., Oomen, R. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. and Visser, R. G. 2003. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant physiology.* 132(4): 1781-1789.
- Volpi, C., Janni, M., Lionetti, V., Bellincampi, D., Favaron, F. and D'Ovidio, R. 2011. The ectopic expression of a pectin methyl esterase inhibitor increases pectin methyl esterification and limits fungal diseases in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 24(9): 1012-1019.
- Voragen, A. G., Coenen, G.-J., Verhoef, R. P. and Schols, H. A. 2009. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry.* 20(2): 263-275.
- Vorhölter, F.-J., Wiggerich, H.-G., Scheidle, H., Sidhu, V. K., Mrozek, K., Küster, H., Pühler, A. and Niehaus, K. 2012. Involvement of bacterial TonB-dependent signaling in the generation of an oligogalacturonide damage-associated molecular pattern from plant cell walls exposed to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pectate lyases. *BMC microbiology.* 12(1): 239.
- Vorwerk, S., Somerville, S. and Somerville, C. 2004. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in plant science.* 9(4): 203-209.
- Wagner, T. A. and Kohorn, B. D. 2001. Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *The Plant Cell.* 13(2): 303-318.
- Wang, A., Lou, B., Xu, T. and Lin, C. 2011. Defense responses in tomato fruit induced by oligandrin against *Botrytis cinerea*. *African Journal of Biotechnology.* 10(22): 4596-4601.



- Wang, C. Y. 1995. Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase, and superoxide dismutase in chilled zucchini squash. *Postharvest biology and Technology*. 5(1): 67-76.
- Weber, J., Olsen, O., Wegener, C. and Von Wettstein, D. 1996. Digalacturonates from pectin degradation induce tissue responses against potato soft rot. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 48(6): 389-401.
- Willats, W. G., Steele-King, C. G., Marcus, S. E. and Knox, J. P. 1999. Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation. *The Plant Journal*. 20(6): 619-628.
- Willats, W. T., McCartney, L., Mackie, W. and Knox, J. P. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Cell Walls*. Springer Netherlands. N. C. Carpita, M. Campbell and M. Tierney. 9-27.
- Wojtasik, W., Kulma, A., Dyminska, L., Hanuza, J., Czemplik, M. and Szopa, J. 2016. Evaluation of the significance of cell wall polymers in flax infected with a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. *BMC plant biology*. 16(1): 1.
- Wolf, S., Hématy, K. and Höfte, H. 2012. Growth control and cell wall signaling in plants. *Annual review of plant biology*. 63: 381-407.
- Wu, X. and Mort, A. 2014. Structure of a rhamnogalacturonan fragment from apple pectin: implications for pectin architecture. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2014.
- Yapo, B. M., Lerouge, P., Thibault, J.-F. and Ralet, M.-C. 2007. Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Polymers*. 69(3): 426-435.
- Yashoda, H. M., Prabha, T. N. and Tharanathan, R. N. 2006. Mango ripening: changes in cell wall constituents in relation to textural softening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86(5): 713-721.
- Zhao, H., Zhao, H., Wang, J., Wang, B. and Wang, Y. 2005. Stress stimulation induced resistance of plant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 43(3): 174-178.