

UCH-FC  
Biotecnología  
5598  
C. 2



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**Proteómica en duraznos:  
Optimización de las condiciones para analizar el  
perfil proteico de las hojas de *Prunus persica***



Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

**Daniel Severin Lea-Plaza**

**Director de Seminario de Título: Dr. Michael Handford**

Mayo, 2009  
Santiago - Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

***“Proteómica en duraznos: Optimización de las condiciones para analizar el perfil proteico de las hojas de Prunus persica”***

**Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

**DANIEL SEVERIN LEA-PLAZA**

*Dr. Michael Handford*  
**Director Seminario de Título**

*Dr. Ariel Orellana López*  
**Co-Director**

### **Comisión de Evaluación**

*Dr. Francisco Chávez Espinosa*  
**Presidente Comisión**

*Dra. Victoria Guixé Leguía*  
**Evaluadora**

*Michael Handford*  
*Ariel Orellana López*  
*Francisco Chávez Espinosa*  
*Victoria Guixé Leguía*

Un sello circular con el texto "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL" y "U. DE CHILE" alrededor del borde.

Santiago de Chile, Octubre de 2009

*A Christian y Rosa María.*





## Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis padres, por su apoyo incondicional y por haber creído en mis dediciones. Al Mati, Coty, Laura y Rosario que me han dado la alegría de saber que siempre podré contar con ellos. A la Nona por recibirme en su hogar cuando lo necesité. Al Tío Chohe y a la Tía Susane, que siempre han estado ahí. A la Eli, por sus alegres cantos. Al Dr. Michael Handford, por su permanente preocupación, su responsabilidad y, principalmente, por su comprensión. Al Dr. Ariel Orellana, por recibirme en su laboratorio y estar siempre dispuesto a conversar entre sus múltiples quehaceres. A Camila por apoyarme cariñosamente y a la familia Mardones por acogerme. A todos mis compañeros de pregrado que contribuyeron, entre carretes y estudios, a mi formación como científico y persona. A toda la gente del Centro de Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional Andrés Bello, a Marcela Jego por su implacable disciplina, a Ricardo Nilo por su generosa disposición y por haber construido los cimientos de los procedimientos empleados en este trabajo. A Claudia Muñoz, Susana Gonzáles, Rebeca Paul, Cecilia Rodríguez, Maribel Donoso, Adrián Moreno e Ignacio Moreno, quienes estuvieron siempre prestos a criticar constructivamente cada vez que tuve la oportunidad de mostrarles mi trabajo. Finalmente, quiero agradecer a Pateste, el santo que me ha acompañado desde los comienzos. Ahora con un nuevo sentido junto al Seba, Charlie, Tío Quarry, Vicho y, por que no decirlo, al incondicional Richi Kawada.

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico de Chile (FONDEF G0711001).

El autor se declara libre de conflictos de intereses.

## Índice de contenidos



PORTADA.....	i
Índice de Figuras .....	iv
Índice de Tablas.....	v
Abreviaturas.....	vi
Glosario.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	9
2.1. Objetivo general.....	9
2.2. Objetivos específicos.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1. Muestreo y diseño experimental.....	10
3.2. Reactivos.....	12
3.3. Pretatamiento de la muestra con TCA/acetona.....	13
3.4. Extracción de proteínas solubles totales de hojas de durazno.....	13
3.5. Cuantificación de proteínas.....	14
3.6. Separación de proteínas en geles de SDS-PAGE de una dimensión.....	14
3.7. Tinción con plata de geles de SDS-PAGE de una dimensión.....	15
3.8. Separación de mediante SDS-PAGE de dos dimensiones.....	15
3.8.1. Isoelectroenfoque.....	15
3.8.2. 2º dimensión.....	16
3.9. Tinción de geles bidimensionales.....	17
3.10. Digitalización y análisis de geles bidimensionales.....	17



3.11. Análisis estadístico.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Optimización de la extracción de proteínas.....	22
4.2. Proteómica diferencial de las hojas.....	28
4.3. Análisis de geles 2D y de las manchas presentes.....	30
5. DISCUSIÓN.....	37
5.1. Optimización de la extracción de proteínas.....	37
5.2. Proteómica diferencial de las hojas.....	39
5.3. Análisis de geles 2D y manchas.....	42
6. CONCLUSIONES.....	46
7. PROYECCIONES.....	47
8. BIBLIOGRAFÍA.....	48
Anexo 1.....	52
Anexo 2.....	55



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Diagrama de flujo para el proceso de generación de geles 2D.	8
<b>Figura 2.</b>	Diseño experimental para la evaluar preliminarmente de la reproducibilidad de los geles 2D.	11
<b>Figura 3.</b>	Diseño experimental para el procesamiento de las muestras.	12
<b>Figura 4.</b>	Identificación de manchas.	18
<b>Figura 5.</b>	Cálculo del punto isoelectrico experimental.	20
<b>Figura 6.</b>	Cálculo del peso molecular de las proteínas.	20
<b>Figura 7.</b>	Evaluación del método de extracción de las proteínas.	23
<b>Figura 8.</b>	Disminución de pigmentos en la muestra debido al tratamiento con TCA/acetona.	24
<b>Figura 9.</b>	Evaluación del rendimiento de obtención de proteínas al remover interferentes antes de realizar la extracción.	25
<b>Figura 10.</b>	Evaluación de las extracciones de proteínas para la estandarización.	26
<b>Figura 11.</b>	Gele bidimensionales de estandarización.	27
<b>Figura 12.</b>	Separación de proteínas obtenidas a partir de hojas de las distintas muestras de duraznero.	28
<b>Figura 13.</b>	Triplicados de Geles 2D para la muestra J57.	29
<b>Figura 14.</b>	Réplica b de geles 2D para cada una de las muestras.	30
<b>Figura 15.</b>	Mancha versus artefacto	31
<b>Figura 16.</b>	Manchas que cambian significativamente entre las muestras.	33
<b>Figura 17.</b>	Reproducibilidad de las réplicas técnicas.	34
<b>Figura 18.</b>	Manchas con expresión diferencial significativa.	36
<b>Figura anexo 2.</b>	Geles 2D de las muestras analizadas.	55



### Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b>	<b>Rendimientos de obtención de proteínas.</b>	<b>25</b>
<b>Tabla 2.</b>	<b>Manchas que cambian significativamente en las muestras.</b>	<b>32</b>
<b>Tabla anexo 1.</b>	<b>Fenotipificación del grado de harinosidad.</b>	<b>52</b>



## Abreviaturas

BCA: ácido bicinconínico

BSA: seroalbúmina de bovino

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etileno diamino tetracético

ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

EST: marcador de secuencia expresada

∞H<sub>2</sub>O: agua bidestilada

IEF: isoelectroenfoque

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro

PSA: persulfato de amonio

SB3-10: propanosulfonato de deciltrimetilamonio

SDS: dodecilsulfato sódico

TCA: ácido tricloroacético

TCEP: tris(B-cloroetil)fosfato

TEMED: N,N,N,N-tetrametiletilendiamina

Kp: kilopondio o kilogramo-fuerza. Unidad de fuerza equivalente a 9,80665 Newtons

## Glosario

*Bootstrap*: Método de remuestreo que permite aproximar la distribución del promedio.

*Warping*: Proceso de manipulación digital de una imagen, en donde se altera la posición de los píxeles con la finalidad de ajustar dos imágenes. En el caso del análisis de geles 2-D, se utiliza para especificar la correspondencia espacial de cada una de las manchas entre dos geles.

## Resumen

Chile es el primer exportador de duraznos y nectarines (*Prunus persica*) frescos del hemisferio sur. Los principales destinos son los EE.UU y Europa. Sin embargo, el valor de la caja de durazno ha disminuido drásticamente en los últimos años, principalmente debido al daño por frío que sufren las frutas al ser transportadas a bajas temperaturas, siendo la harinosidad, uno de los síntomas más evidentes de este daño. Por esta razón, urge la necesidad de desarrollar nuevas variedades poco susceptibles a este desorden fisiológico en los programas de mejoramiento genético con los requerimientos del mercado. Para facilitar su desarrollo, la proteómica es una herramienta poderosa para buscar las proteínas que sirvan como marcadores fenotípicos para el mejoramiento genético asistido.

En este seminario de título, se implementó la técnica de geles bidimensionales para separar los extractos de las proteínas provenientes de las hojas de duraznero, con la finalidad de analizar los perfiles proteicos de las hojas provenientes de los árboles en los que segrega el fenotipo de la susceptibilidad a la harinosidad en los frutos. Debido a que los lípidos, pigmentos y polifenoles interfieren con la extracción y la separación de proteínas, se adaptó exitosamente un método de remoción de estos compuestos. En los geles 2D, se detectaron 145 manchas para ser analizadas, lo cual resultó ser satisfactorio comparado con lo obtenido en otros estudios proteómicos del tejido foliar. El método de separación de las proteínas en geles 2D resultó ser altamente reproducible, lo cual fue determinado por un agrupamiento jerárquico de las réplicas técnicas. Se encontraron 5 manchas significativamente más abundantes en las hojas de un grupo de muestras provenientes de árboles susceptibles a la harinosidad (H), respecto a muestras menos susceptibles a este desorden (J). Estas manchas serán

secuenciadas y la identidad de las proteínas podría dar indicios claves de los mecanismos moleculares involucrados en el fenómeno de la harinosidad inducida por frío en los duraznos. Además, en un futuro programa de mejoramiento genético, se podría descartar precozmente plántulas que expresan estos marcadores fenotípicos para la susceptibilidad a la harinosidad.

## Abstract

Chile is the largest exporter of peaches and nectarines (*Prunus persica*) in the southern hemisphere. The main destinations for these fruits are USA and Europe. However, in recent years the export value of peaches has decreased drastically, mainly due to the chilling injury that the fruits suffer whilst being transported at low temperatures, with mealiness being one of the most obvious symptoms. Therefore, in breeding programmes, there is an urgent need to develop new varieties which do not suffer from this physiological disorder. To assist in their development, proteomics has emerged as a powerful tool to search for proteins which act as phenotypic markers in assisted breeding programmes.

In this thesis, 2-D gels for the separation of protein extracts from peach leaves were generated, with the aim of analysing differences in the protein profiles in leaves of a population segregating for the susceptibility of fruit mealiness. Given that lipids, pigments and polyphenols interfere with protein extraction and separation, a new method was successfully adapted to remove these compounds from the leaf samples. In 2-D gels, a total of 145 spots were detected and analysed, a number that proved to be satisfactory compared with other proteomic studies performed from leaf tissue. The separation of proteins in 2D gels was highly reproducible, as determined by hierarchical clustering of technical replicates. Five significantly more abundant spots were found in samples extracted from leaves of trees producing fruits susceptible to mealiness compared to trees producing fruits less susceptible to this disorder. These spots will be sequenced and the identity of proteins may provide key insights into the molecular mechanisms involved in chilling-induced mealiness of peaches. Additionally, in future breeding programmes, seedlings that express these 'mealiness' markers could be discarded at an early stage.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los duraznos [*Prunus persica* (L.) Batsch] y nectarines [*P. persica* (L.) Batsch, var. nectarina] pertenecen a la familia Rosaceae. Como otros frutos con hueso, los duraznos y los nectarines están fuertemente relacionados genéticamente (Brady, 1993). Ambos tienen un endocarpo lignificado que encierra a la semilla, un exocarpo delgado y un mesocarpo caroso con altos contenidos de azúcares que, entre otras cosas, convierte a este fruto en un producto alimenticio muy apetecido.

Estos frutos maduran y se deterioran rápidamente a temperatura ambiente, por esta razón, se almacenan en frío para retardar estos procesos y poder exportarlos a mercados distantes. Sin embargo, cuando los frutos susceptibles son almacenados desde 1 o 2 semanas a temperaturas entre 2 a 5 °C, se desarrollan los síntomas visibles del daño por frío (Anderson, 1979; Lill y col, 1989; Crisosto y col, 1999). Estos son gatillados por una combinación entre las bajas temperaturas y el tiempo de almacenamiento, y está influenciado genéticamente. Se manifiesta principalmente de tres maneras: enrojecimiento radial del interior del mesocarpo, pardeamiento de la carne o, el síntoma más fácil de cuantificar y que más causa el rechazo de los consumidores, harinosidad (Lurie & Crisosto, 2005). Así, la aparición de los síntomas del daño por frío son determinantes en el proceso de transporte y almacenaje post-cosecha de los frutos, ya que reducen la aceptación de los consumidores (Crisosto y col, 1997)

Chile es el primer productor de duraznos y nectarines en el hemisferio sur. Actualmente, más del 80% de la producción se exporta; aproximadamente el 58% va a EE.UU., el 23% a Europa y el 4% a Asia. (ODEPA, 2008). Para llevar la fruta a estos mercados en barco, se requieren entre 4 a 6 semanas, por lo tanto el daño por frío constituye una de las principales causas del estancamiento y disminución de los volúmenes exportados y precios obtenidos por Chile (DECOFRUT, 2004).

La aparición de la harinosidad en los frutos se correlaciona con los cambios en el metabolismo de las pectinas de la pared celular. Al respecto, se han planteado dos hipótesis, y ambas involucran esta matriz extracelular. La primera apunta a la formación de geles compuestos por complejos de calcio-pectato con las pectinas de alto peso molecular en la lámina media (Ben Arie & Lavee, 1971; Zhou y col, 2000). La segunda indica que la harinosidad se debe a una disminución de la adhesión intercelular que reduce la ruptura de las células cuando la fruta es mordida, con lo cual se impide la liberación del contenido celular (King y col, 1989; Brummell y col, 2004). También cabe destacar, que la mantención de la capacidad de producir etileno en los frutos almacenados en frío, podría ser crucial para prevenir los desordenes fisiológicos relacionados con daño por el frío (Dong y col, 2001; Zhou y col, 2001)

A pesar de que existen influencias no genéticas en la incidencia del daño por el frío, se ha visto que la herencia de estos rasgos es significativa y consistente en las distintas progenies estudiadas (Peace y col, 2005). De manera que, para resolver este problema a largo plazo, una estrategia promisoría es la búsqueda de rasgos de carácter cuantitativo (QTLs) y el desarrollo del mejoramiento genético asistido por los marcadores moleculares (Lurie & Crisosto, 2005).

Tanto el gen de la poligalacturonasa (Peace y col, 2005) como los polimorfismos de una base, en especial en este mismo gen (Morgutti y col, 2006), son candidatos como marcadores para la selección genética de *Prunus persica* que posean pulpa fundente. Esta evidencia fortalece la idea de generar marcadores mediante genómica funcional. A comienzos de la presente década, el gobierno chileno, financió un proyecto multidisciplinario entre las Universidades, Institutos y empresas chilenas del rubro para enfrentar científicamente el problema de la harinosidad. En el proyecto Genoma I "Genómica funcional en nectarines: Plataforma para potenciar la competitividad de Chile en la exportación de fruta" (2002-2005) se construyeron 4 librerías de cDNA de frutos de *Prunus persica* en distintos estadios de postcosecha. Se secuenciaron 50.000 ESTs, los cuales se analizaron mediante bioinformática y se encontraron 9.000 genes que pueden expresarse en la postcosecha. Finalmente, utilizando genómica funcional, se encontró que un número significativo<sup>1</sup> de los genes y las proteínas presentaban cambios de expresión, bajo condiciones que correlacionan a la harinosidad de los frutos.

En un programa de mejoramiento genético, una dificultad para buscar y utilizar los marcadores en los frutos de *Prunus persica* es que los frutos tardan entre 3 y 4 años en aparecer posterior a la germinación. Sin embargo, las hojas aparecen después de un par de semanas de haber germinado la semilla, lo cual convierte a este último, en un interesante órgano para ser utilizado en un programa de mejoramiento genético.

---

<sup>1</sup> No es posible revelar la cantidad ni la identidad de los genes y proteínas, puesto que esa información es confidencial.



Hay evidencias de que el estado fisiológico y metabólico de las hojas de las manzanas (*Malus x domestica* Borkh. cv. "Greensleeves"; familia Rosaceae) se relaciona con las propiedades organolépticas del fruto (Teo y col, 2006). En *Prunus persica*, tanto las características morfológicas como las fisiológicas presentes en las hojas, se relacionan directamente con el fenotipo del resto del árbol, incluido los frutos (Layne, 2008). Por ejemplo, el rasgo "redleaf" de algunos individuos, se distingue por el color rojo de la epidermis de las hojas jóvenes y los frutos. Además es un rasgo que depende de uno o quizás dos genes (Okie, 1998). Estos resultados sugieren que el estado fisiológico de las hojas de *Rosaceae*, en general, y de *Prunus persica*, en particular, puede relacionarse con la calidad de los frutos.

Por lo tanto, en la continuación del proyecto Genoma I de Genómica funcional de los nectarines (Genoma II) se pretende, entre otros objetivos, encontrar en las hojas, marcadores moleculares y fenotípicos de los frutos que se mantienen jugosos después de estar almacenados en frío. Así, las diferencias observadas en la expresión de genes o proteínas en las hojas precoces del duraznero servirán para generar candidatos para marcadores moleculares y proteicos que serán verificados al correlacionar su presencia con la jugosidad de los frutos provenientes de cada individuo. Es así que en un programa de mejoramiento genético posterior se podrá analizar precozmente los individuos de un cruzamiento en el estado de las plántulas e identificar aquellos que no generarán frutos harinosos, eliminar las que no servirán y así bajar los costos (horas hombre, preparación del suelo, cuidado de los árboles, químicos y otros) en el vivero.

Para generar marcadores moleculares y proteicos que permitan asistir el mejoramiento genético se utilizan la genómica funcional y la proteómica. La primera estudia el

comportamiento global del genoma de un individuo frente a distintas condiciones ambientales. Sin embargo, los estudios basados en secuencias de ADN y abundancia de ARNm no son suficientes para predecir la estructura, función, cantidad y actividad de las proteínas en la célula.

La proteómica aparece como un concepto importante en la era post-genómica, refiriéndose al estudio a gran escala de las proteínas. El proteoma es el conjunto de proteínas, incluyendo todas las modificaciones post-traduccionales, de un organismo en una condición dada. Previamente, la proteómica se ha utilizado tanto para estudiar características de post-cosecha de *Prunus persica* (Abdi y col, 2002) como para desarrollar los programas de mejoramiento genético en las plantas (Thiellement y col, 2002).

Entre otras metodologías, el proteoma se puede estudiar mediante cromatografía líquida o electroforesis con geles de poliacrilamida de dos dimensiones (2-D PAGE, *two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*). La segunda es la técnica más extendida, permite la separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico y al peso molecular. Las imágenes obtenidas se pueden analizar con un programa computacional y determinar la intensidad de una mancha, que es proporcional a la abundancia, en las hojas, de la proteína que migró en ese lugar del gel. De esta manera se pueden comparar los perfiles proteicos de un organismo en condiciones normales y en otra condición para la cual se desee encontrar algún marcador. Así la abundancia diferencial de una mancha resulta ser un marcador putativo para la condición deseada. Al secuenciar la proteína presente en la mancha, es posible mapear el sitio del genoma que controla la expresión de este marcador. Esta

información constituye una herramienta importante para encontrar genes candidatos que controlan un rasgo de carácter cuantitativo (de Vienne y col, 1999).

Para generar una buena resolución en la separación del proteoma en los geles 2-D, es necesario extraer una considerable cantidad de las proteínas de la muestra. Este proceso se dificulta muchas veces por la presencia impurezas que interaccionan con las proteínas e impiden realizar la extracción y el isoelectroenfoque adecuadamente. Los lípidos se unen a las proteínas, mediante interacciones hidrofóbicas y generan una heterogeneidad artefactual en la primera dimensión, lo cual genera líneas horizontales en los geles 2-D (Wessel & Flugge, 1984). Los ácidos nucleicos aumentan la viscosidad de la muestra y obstruyen los poros de la matriz de poliacrilamida, además pueden formar complejos con algunas proteínas, de manera también interfieren con la separación (Blomberg y col, 1995). Los compuestos fenólicos pueden unirse reversiblemente con los péptidos mediante enlaces de puentes de hidrógeno y además pueden modificar covalentemente a las proteínas a través de una reacción oxidativa catalizada por las enzimas (Damerval y col, 1986). Por su parte, los polisacáridos obstruyen los poros del gel de isoelectroenfoque (IEF, 1ª dimensión) y los polisacáridos negativamente cargados pueden formar enlaces iónicos con las proteínas (Rabilloud, 1996). Finalmente, las altas concentraciones de sales o detergentes también pueden interferir con la migración adecuada de las proteínas. Existen diversos tratamientos para la extracción de las proteínas, de manera que es necesaria la optimización e implementación de un procedimiento acorde a los contaminantes que la muestra pueda tener. Por todas estas razones, fue imprescindible para este seminario de título adaptar un procedimiento de remoción de impurezas de las hojas del duraznero, basándose en uno publicado para las hojas del olivo (Wang y col, 2003) (ver sección 3.3).

Posterior a la extracción, es necesario cuantificar la concentración de las proteínas para que la cantidad de proteínas separadas en el IEF sea equivalente y así poder comparar la expresión relativa en muestras con distintos tratamientos. Al finalizar la extracción de las proteínas, estas quedan resuspendidas en un amortiguador que permite realizar el IEF. Este tampón posee compuestos reductores que pueden interferir con la cuantificación, posiblemente por interacciones con las proteínas. Se ha visto que mediante el método de Bradford se obtiene menor grado de interferencia de estos compuestos, que los métodos de Lowry y del BCA. Por esta razón, el método de Bradford es el más adecuado para cuantificar proteínas en un amortiguador de isoelectroenfoco (Kao y col, 2008).

La primera dimensión consiste en distribuir las proteínas a lo largo de un gel, unido a una tira de plástico y con un gradiente de pH, (tira IEF). Las proteínas son anfóteras y tienen una carga neta que cambia de acuerdo al pH del entorno, pudiendo ser positiva, negativa o cero. De esta forma, al ser sometidas a un campo eléctrico, las proteínas migrarán a lo largo del gel debido a la carga neta de las mismas. Sin embargo, las cargas netas de las proteínas van cambiando ya que se van ubicando en sectores del gel con distinto pH, hasta que alcanzan su punto isoeléctrico y dejan de migrar, así se enfocan las distintas proteínas.

Previo a la segunda dimensión, se deben reducir los puentes de disulfuro de las proteínas y alquilarlos con DTT y iodoacetamida, respectivamente (Herbert y col, 2001). Además se iguala la relación masa/carga de todas las proteínas mediante SDS. Sólo de esta manera es posible separarlas según su peso molecular en un gel de poliacrilamida, independiente de cuál sea la forma de éstas. Posteriormente, la tira IEF

se ubica en el extremo superior del gel, se agrega azul de bromofenol en agarosa, para visualizar el frente de migración, y se somete a un campo eléctrico hasta que las proteínas se han distribuido a lo largo del gel por su peso molecular.

Antes de teñir las proteínas, los geles se dejan fijando para impedir que éstas sigan difundiendo. Por último, los geles son ubicados en un digitalizador y las imágenes generadas se analizan con un programa que permite identificar y comparar las manchas entre los distintos geles. La proteómica involucra numerosos procedimientos críticos, cada uno de los cuales podría alterar dramáticamente la calidad de los resultados obtenidos (Figura 1).

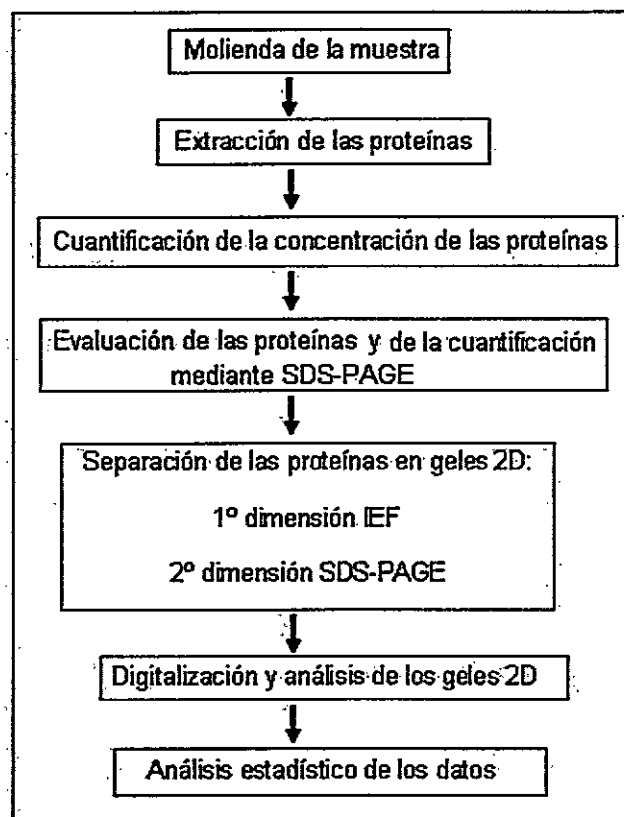


Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

-Analizar el perfil de expresión proteica en las hojas de *Prunus persica* var. Venus, con frutos con distintas susceptibilidades a la harinosidad.

### **2.2. Objetivos específicos**

-Optimización de la extracción de las proteínas solubles de las hojas de *Prunus persica*.

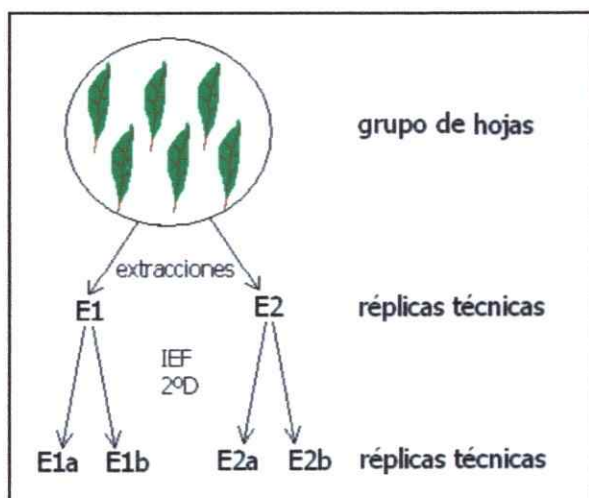
-Obtención de los geles bidimensionales a partir de los extractos de las proteínas presentes en las hojas de los árboles que producen frutos con distintas susceptibilidades a la harinosidad.

-Análisis de los geles bidimensionales y de las manchas presentes en ellos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Muestreo y diseño experimental

Previo a este seminario, se cruzó la variedad Flamekist de *Prunus persica* con la variedad Stark Red Gold (con frutos susceptibles y poco susceptibles a tomarse harinosos, respectivamente), lo que generó la variedad Venus, la cual es poco susceptible a la harinosidad. Luego, se realizó una autopolinización de la variedad Venus, y la progenie fue fenotipificada respecto al grado de susceptibilidad a la harinosidad de los frutos (anexo 1). La harinosidad es un parámetro comúnmente cuantificado de acuerdo al porcentaje de jugo del fruto. Esto se mide exponiendo los frutos a 4 °C durante 21 días, luego se dejan madurar a 20 °C hasta que alcanzan una firmeza de pulpa de 1 kp. Finalmente se someten todos los frutos a la misma presión y se mide el porcentaje del jugo liberado (Crisosto & Labavitch, 2002). Esta progenie constituye una población de 77 individuos segregantes para dicho fenotipo. Las mediciones de la jugosidad de los frutos fueron realizadas el año 2008 por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA, La Platina. Las hojas de las mismas plantas fueron muestreadas en la temporada 2007/2008 por la misma institución, antes de la realización de este Seminario de Título. Las hojas fueron sacadas desde las ramillas localizadas en la altura media de la copa de los árboles, de las cuales se tomaron hojas del tercio medio, 100% extendidas, verdes y sin daños aparentes. Se tomaron 10-12 hojas por planta y se congelaron a -80 °C hasta su posterior análisis. La cantidad de hojas muestreadas fue suficiente para realizar las réplicas técnicas, aunque no se colectó una réplica biológica en el momento de realizar el muestreo.



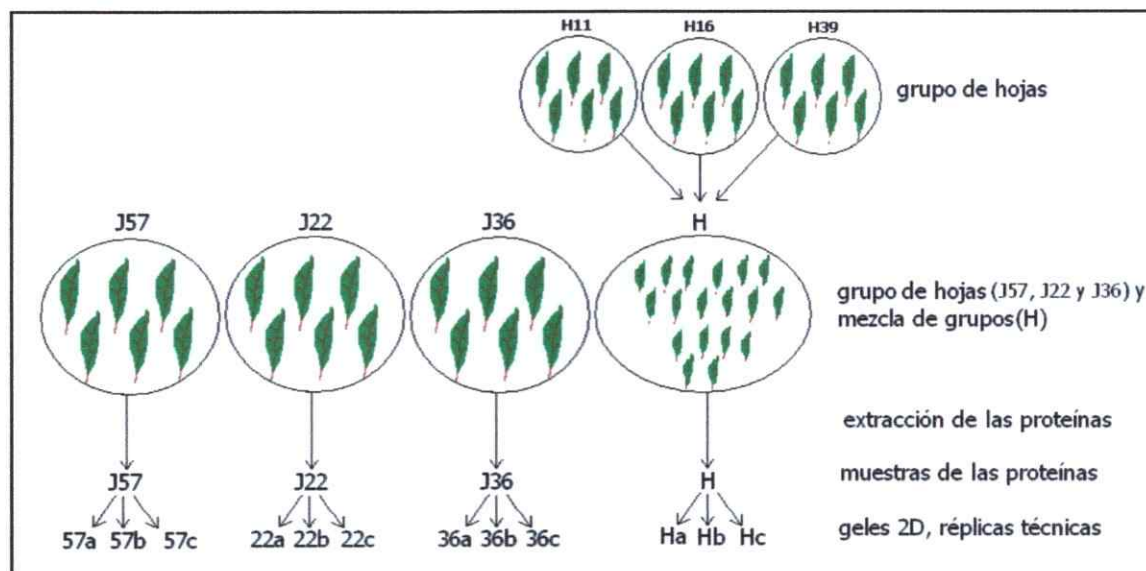
**Figura 2.** Diseño experimental para evaluar preliminarmente la reproducibilidad de los geles 2D. De un mismo grupo de hojas del duraznero se hicieron dos extracciones de las proteínas para generar las réplicas técnicas de la extracción (E1 y E2). Se confeccionaron 2 geles 2-D (a y b) por extracción, a modo de generar réplicas técnicas de la separación de las proteínas.

En este Seminario, después de evaluar el uso de un pretratamiento para la extracción de las proteínas (sección 3.1), se procedió a evaluar la reproducibilidad de los geles 2-D. El diseño experimental se muestra en la Figura 2. Se realizaron 2 extracciones independientes de un grupo de hojas proveniente de un mismo individuo (réplicas técnicas de la extracción E1 y E2). A partir de cada extracción, se realizaron 2 réplicas técnicas para la generación de los geles bidimensionales (réplicas a y b).

Se utilizaron las hojas provenientes de los 3 individuos con los frutos con menor susceptibilidad a la harinosidad y de 3 de los árboles con mayor susceptibilidad durante la temporada 2007/2008 (ver anexo 1). A las primeras se les denominó "J36", "J57" y "J22". Las segundas se denominaron "H11", "H16" y "H39". Con estas últimas, se confeccionó un grupo con igual cantidad de peso fresco de cada una de estas últimas muestras mencionadas y se le denominó muestra "H" (Figura 3). De esta manera, se focaliza la búsqueda en proteínas expresadas consistentemente en cada una de las muestras J y menos representadas en las muestras H. Se efectuaron extracciones de las proteínas para las muestras J36, J57, J22 y H. Las proteínas extraídas se



separaron en los geles bidimensionales utilizando 3 réplicas técnicas (a, b y c) para cada muestra, como se ilustra en la Figura 3.



**Figura 3. Diseño experimental para el procesamiento de las muestras.** Se muestra la estrategia utilizada para mezclar las muestras de las hojas. Se utilizaron grupos de hojas de 3 de los árboles con los frutos con menor susceptibilidad a la harinosidad (J57, J22 y J36). Las proteínas extraídas de cada grupo se separaron en los geles 2-D, y cada separación se hizo por triplicado. Además se utilizaron grupos de los 3 árboles con los frutos más susceptibles a la harinosidad, con los cuales se generó un nuevo grupo, del cual se extrajeron las proteínas que se separaron en los geles 2D.

### 3.2. Reactivos

Todos los reactivos utilizados eran de grado analítico y fueron suministrados por distintas empresas: de Sigma se utilizó PMSF, anfolito 3-10, brilliant blue G, 2-mercaptoetanol, N,N'-metilen-bis-acrilamida, SB3-10, TCEP, azul de bromofenol y aceite mineral; de Merck se usó etanol, ácido acético, acetona, sacarosa, KCl, EDTA, ditionito de sodio, carbonato de sodio, nitrato de plata, urea, hidrogenocarbonato de sodio, ácido fosfórico y acetato de amonio; de US biological, Tris base, CHAPS y glicina; de Winkler, fenol saturado básico, acrilamida, PSA, DTT, formaldehído y TCA; de Bio Rad, anfolito 5-7; de Applichem, TEMED y iodoacetamida; de Pierce BSA; de

J.T. Baker, tiourea y glicerol; de Calbiochem, SDS; de Fermentas, marcador de peso molecular de proteínas, no teñido.

### **3.3. Pretratamiento de la muestra con TCA/acetona**

Se pesó 1,5 g del grupo de hojas de cada una de las 4 muestras (J57, J22, J36 y H). Cada muestra se depositó en un mortero con pistilo, ambos previamente enfriados a 4 °C, se agregó nitrógeno líquido y se molió hasta obtener un polvo muy fino, el cual se depositó en dos tubos para centrifugación de 15 mL enfriados en hielo.

A la muestra molida se le agregó 5 mL de acetona enfriada a -20 °C, se agitó vigorosamente por 1 min. y se centrifugó a 10.000 g por 5 min. a 4 °C. Posteriormente, este procedimiento se repitió 2 veces con 5 mL de TCA en acetona al 10% enfriado a -20 °C y una vez con 5 mL de acetona al 80% enfriada a 4 °C. Finalmente la muestra se dejó secando a temperatura ambiente por 1 hora y 15 min bajo campana (basado en Wang y col, 2003).

### **3.4. Extracción de proteínas solubles totales de hojas de durazno**

Al sedimento, producto del pretratamiento, se le adicionó 4,5 mL de amortiguador de extracción (sacarosa 24% p/v, Tris base 50 mM pH 7,8, KCl 1 M, EDTA 6 mM, DTT 2 mM, PMSF en etanol 2 mM) y 5 mL de fenol saturado con amortiguador Tris 0,1 M pH 8,0. Se agitó vigorosamente por 10 min. y se centrifugó 15 min. a 10.000 g. Se traspasó la fase superior (fenólica) a otro tubo de vidrio para centrifugación de 15 mL, se agregó 4,5 mL de amortiguador de extracción, se agitó vigorosamente por 10 min y se centrifugó 15 min. a 10.000 g. Nuevamente se retiró la fase fenólica y se distribuyó en 8 tubos, se agregó a cada tubo cinco volúmenes de acetato de amonio 0,1 M en metanol y se guardó a -20 °C por 1 h (Hurkman & Tanaka, 1986). Se centrifugó por 15

min a 10.000 g y se lavó el precipitado 3 veces con 3 mL de acetato de amonio en metanol 0,1 M enfriado a -20 °C. Se lavó una vez con 4 mL de acetona al 80% enfriada a -20 °C. Se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió el sedimento de cada uno de los tubos, se agitó vigorosamente durante 3 min, en 300 µL totales de amortiguador IEF (urea 5 M, tiourea 2 M, SB3-10 0,07 M, CHAPS 2% p/v, anfolito3-10 0,1% p/v, anfolito5-7 0,2% p/v), los cuales se pasaron a un tubo de 1,5 mL. Se incubó la muestra a 28 °C por 10 min., se centrifugó por 15 min. a 12500 × g, se traspasó el sobrenadante a otro tubo de 1,5 mL y se guardó a -80 °C.

### **3.5. Cuantificación de las proteínas**

La concentración de las proteínas se cuantificó mediante el ensayo de Bradford (Bradford. 1976) modificado para placas de ELISA de 96 posillos. La curva de calibración se realizó con 0, 2, 4 y 6 µg de BSA. Se utilizaron diluciones de las proteínas extraídas de las hojas. Todas las mediciones fueron realizadas en triplicado. La absorbancia se midió a 590 nm en un lector de placas de ELISA (ELx800 Universal Microplate Reader; BIO-TEK INSTRUMENTS).

### **3.6. Separación de las proteínas en geles de SDS-PAGE de una dimensión**

La calidad de las extracciones de las proteínas se evaluó por SDS-PAGE (Laemmli. 1970). Se utilizaron geles de poliacrilamida al 12%. Aproximadamente el 85% inferior del gel correspondió al gel separador (acrilamida 11,7% p/v, N,N'-bis-acrilamida 0,3% p/v, Tris-HCl 0,38 M pH 8,8, SDS 0,1% p/v, PSA 0,05% p/v, TEMED 0,05% v/v), el resto al gel concentrador (acrilamida 3,8% p/v, N,N'-bis-acrilamida 0,1% p/v, Tris-HCl 0,13 M pH 6,8, SDS 0,1% p/v, PSA 0,05% p/v, TEMED 0,1% v/v). En cada carril se agregó 5 µg de proteína de cada muestra más 3 µL de amortiguador de carga (Tris HCl

60 mM pH 6,8, glicerol 25%, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 5% y trazas de azul de bromofenol), el gel se sometió a una diferencia de potencial de 100 volts hasta que el frente (azul de bromofenol) salió del gel. Posteriormente, para que las proteínas no difundan por el gel, éste se dejó fijando por 3 horas en una solución de etanol 30% y ácido acético 10%.

### **3.7. Tinción con plata de geles de los SDS-PAGE de una dimensión**

Los geles, previamente fijados, se lavaron 3 veces por 12 min con etanol 30% y una vez con  $\text{ddH}_2\text{O}$  por 10 min. Se incubó por 1 min con ditionito de sodio 1,44 mM, se lavó 3 veces con  $\text{ddH}_2\text{O}$  por 20 s y se tiñó con una solución de nitrato de plata 11,8 mM y formaldehído 2,2 mM por 20 min para luego lavar con  $\text{ddH}_2\text{O}$  por 1 min. Los geles se revelaron con una solución de carbonato de sodio 6% p/v formaldehído 0,4 M. Primero se adicionó el 30% de la solución, se dejó oscurecer, se eliminó y luego se agregó el resto. Se agregaron 50 mL de una solución de ácido acético 3,5% v/v, se esperó que burbujeara, se eliminó y se agregaron otros 50 mL de la misma solución. Finalmente se lavó 3 veces con  $\text{ddH}_2\text{O}$  por 10 min cada vez, se ubicaron los geles en un transiluminador y se fotografiaron con una cámara digital Olympus camedia c-7070 con una resolución de 7,1 megapíxeles.

### **3.8. Separación de las proteínas mediante SDS-PAGE de dos dimensiones**

#### **3.8.1. Isoelectroenfoque (primera dimensión)**

Las proteínas resuspendidas en amortiguador IEF, se incubaron a 28 °C por 10 min. y se centrifugaron 5 min. a 12.500 g. Luego se cargó 75 µg de proteína en la cámara de isoelectroenfoque junto con 6,6 µL de DTT 1 M, 3,1 µL de TCEP 0,5 M y amortiguador IEF hasta completar 310 µL, para cada muestra, sobre lo cual se colocó una tira en el

rango de pH 3-10 no lineal (17 cm; Bio-Rad) y se incubó 15 min. para la hidratación del gel. La tira se introdujo en el dispositivo de isoelectroenfoque (PROTEAN IEF cell; Bio-Rad) y se pusieron pequeños trozos de papel filtro, previamente humedecidos con agua milliQ, en los extremos de la tira. Luego se depositó 1,7 mL de aceite mineral para disminuir la pérdida de volumen por evaporación de agua. El equipo permite aumentar el voltaje de manera lenta, lineal o rápida. Se dejó hidratando activamente por 9 h a 50 V (aumento lineal) y 20 °C. Luego se elevó el potencial a 150 V, de manera lineal, por 30 min, esto permitió que las sales y otras impurezas de la muestra migraran hacia los papeles absorbentes. La diferencia de potencial se aumentó a 2000 V, también linealmente, permaneciendo fija 1 h y 45 min. Se elevó el voltaje lentamente hasta 6000 V, permaneciendo durante 3 h y 30 min a esa intensidad. Por último se aumentó lentamente la tensión a 10.000 V por 7 h. Las tiras se guardaron a -20 °C.

### **3.8.2. SDS-PAGE (segunda dimensión)**

Las tiras con las proteínas electroenfocadas se incubaron con agitación durante 10 min. en amortiguador de equilibrio (Tris HCl 375 mM pH 8,8, SDS 2% p/v, glicerol 20% v/v, urea 6 M) con DTT 2% y 10 min. en amortiguador de equilibrio con yodoacetamida 2,5%. Con este tratamiento todas las proteínas quedan desplegadas y cargadas negativamente de manera que puedan ser posteriormente separadas por su peso molecular en un gel de SDS-PAGE. Los geles utilizados para la 2ª dimensión fueron de 17 x 17 cm, siendo el 15% superior el gel concentrador (acrilamida 3,8% p/v, N,N'-bis-acrilamida 0,1% p/v, Tris-HCl 0,13 M pH 6,8, SDS 0,1% p/v, PSA 0,05% p/v, TEMED 0,1% v/v) y el resto el gel separador (acrilamida 11,7% p/v, N,N'-bis-acrilamida 0,3% p/v, Tris-HCl 0,38 M pH 8,8, SDS 0,1% p/v, PSA 0,05% p/v, TEMED 0,05% v/v). Se utilizó el sistema Protean (BioRad), para utilizar 6 o 2 geles simultáneamente. Las tiras

se sumergieron en tampón de corrida (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% p/v, pH 8,3), posteriormente se situaron en la parte superior de los geles y se agregó azul de bromofenol en agarosa para visualizar el frente de corrida. Se mantuvo la temperatura del sistema a 17 °C. Se ubicaron los geles en la cámara con amortiguador de corrida y se les aplicó una corriente constante de 12 mA, con una diferencia de potencial y potencia aproximadas de 100 V y 250 W, respectivamente, hasta que el frente comenzó a salir del gel, aproximadamente 1800 V ·h. Posteriormente, los geles se fijaron por 3 h en recipientes con 200 mL de etanol 30% y ácido acético 10%.

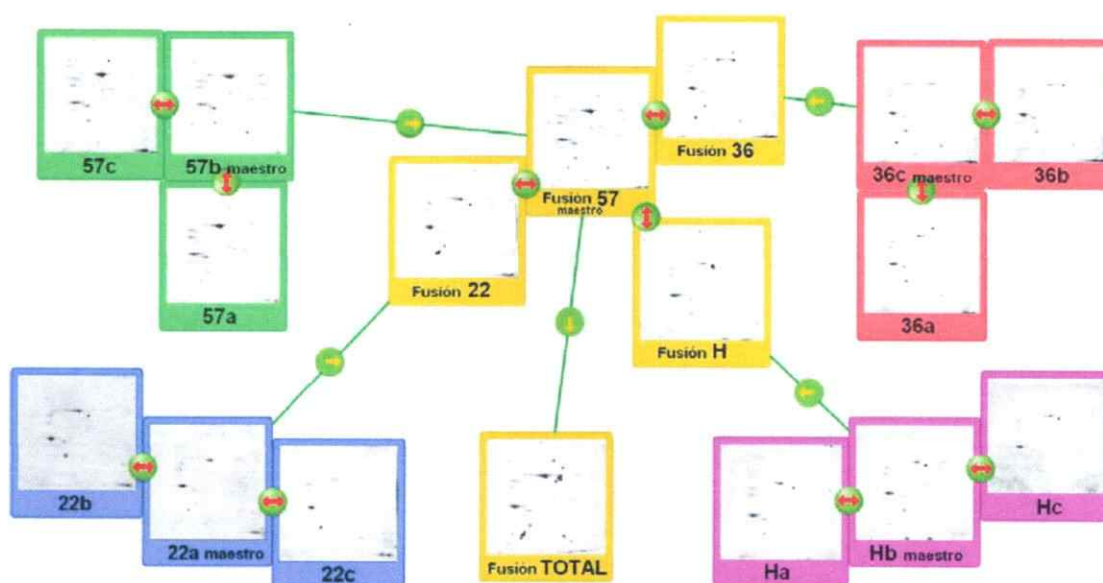
### **3.9. Tinción de los geles bidimensionales**

Para teñir las proteínas, los geles se incubaron 30 min. con agitación en una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,3 M y  $\text{NaHCO}_3$  30 mM. Luego se incubaron 1 h con agitación y oscuridad con la tinción de proteínas Deep Purple (Amersham Deep purple total protein stain; GE Healthcare) diluida 2000 veces. Por último, se realizaron dos lavados en ácido acético al 7,5% por 15 min. y con agitación. En cada uno de los pasos se utilizaron 200 ml de solución por gel.

### **3.10. Digitalización y análisis de los geles bidimensionales**

Para cada uno de los geles se generó una imagen digital con una resolución de 100  $\mu\text{m}$ , para lo cual se utilizó un dispositivo digitalizador de imagen (Molecular Imager FX; Bio-Rad) y un programa de captura de imagen (Quantity One v.4.5.2). El fluoróforo, presente en los geles, se excitó con 532 nm y se capturó la señal emitida con longitud de onda igual o mayor a 555nm. La imagen generada fue convertida al formato TIFF y fue analizada con el programa Delta2D Versión 4.0.2; DECODON.

Para cada uno de los triplicados se eligió el que presentó manchas mejor definidas y con menor señal de fondo, designándolo como gel maestro. La imagen del gel maestro de cada una de las muestras se traslapó con los otros dos triplicados y se especificó la correspondencia entre cada una de las manchas mediante el proceso de *warping* (ver glosario y Figura 4), el cual se muestra en la Figura 4 con flechas bidireccionales rojas.

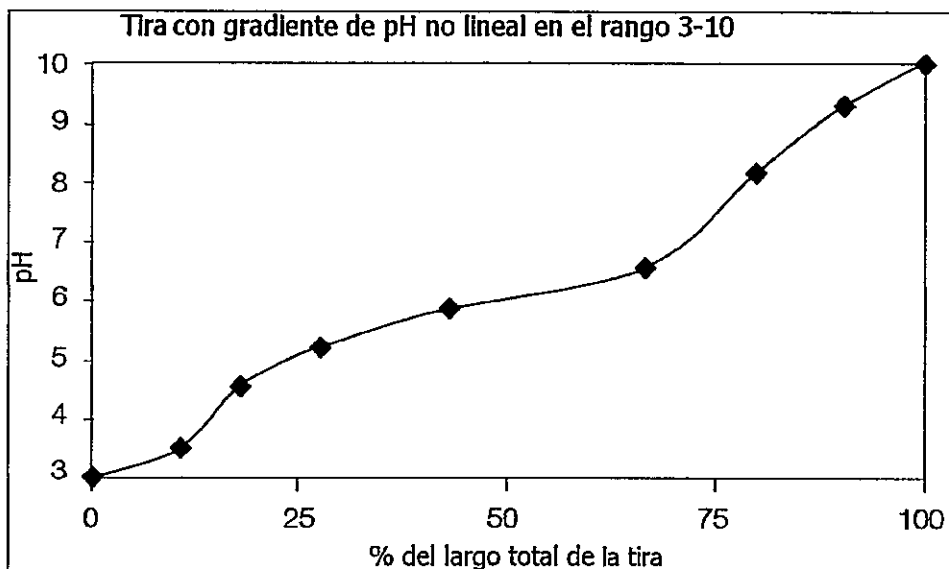


**Figura 4. Identificación de las manchas.** Para identificar las manchas se procedió con los siguientes pasos: se encontró una correspondencia en varios puntos de las imágenes entre las distintas réplicas de las muestras (flechas rojas presentes en las imágenes verdes, azules, rojas y moradas), esto constituye el *warping*. Se generó una imagen de fusión para cada muestra (flechas amarillas provenientes de las muestras). Se realizó el *warping* entre una imagen de fusión y todas las demás (flechas rojas en las imágenes amarillas). Finalmente se generó la imagen de fusión TOTAL (flecha amarilla proveniente de las imágenes de fusión) en la cual se identificó la ubicación de las manchas, la cual se transfirió virtualmente al resto de los gels.

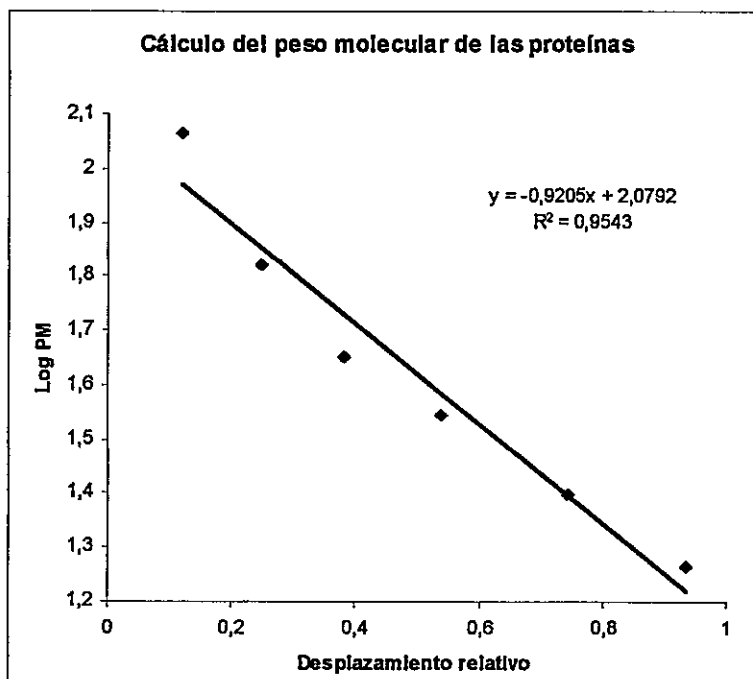
Luego se generó una imagen de fusión, flecha amarilla, para cada una de las muestras. Esta imagen no corresponde a un promedio de las intensidades o formas de las manchas presentes en las réplicas, sino que resume la ubicación de todas las manchas después del proceso de *warping* realizado entre los triplicados que la

generaron. Luego se eligió una de las imágenes de fusión como imagen maestra para realizar el *warping* entre todas las imágenes de fusión. Posteriormente, se creó una imagen de fusión TOTAL con las imágenes de fusión previamente generadas. En esta última, se detectaron todas las manchas presentes en alguno de los geles, en una sola imagen. Luego se transfirieron automática y virtualmente al resto de los geles. Finalmente se obtuvo el porcentaje de volumen de cada una de las manchas en los distintos geles. Estos datos se exportaron al programa Microsoft Excel para su análisis posterior. Para las manchas que cambian significativamente en alguna de las muestras, se proyectó su ubicación en el extremo superior del gel bidimensional, lo cual corresponde a un porcentaje del largo total de la tira. Este valor se interpoló en la curva de pH versus % del largo total de la tira (Figura 5) y así se calculó el punto isoeléctrico experimental (ver Tabla 2). Se confeccionó una curva de calibración para determinar el peso molecular de estas manchas (Figura 6). Se graficó el logaritmo del peso molecular (Log PM) de las proteínas estándar frente al desplazamiento relativo de las bandas correspondientes. Luego se interpoló el valor del desplazamiento relativo de las manchas en cuestión en la curva de calibración y se calculó el peso molecular.





**Figura 5. Cálculo del punto isoeléctrico experimental.** Las tiras utilizadas tenían un gradiente no lineal de pH en el rango de 3 a 10. Para calcular el punto isoeléctrico de una mancha se interpoló en la curva el % del largo total de la tira al cual la proteína, correspondiente a esa mancha, migró. Este gráfico fue provisto por el soporte técnico Bio-Rad, el fabricante de las tiras IEF.



**Figura 6. Cálculo del peso molecular de las proteínas.** Se confeccionó una curva de calibración con los valores del factor de retención ( $R_f$ ) y del logaritmo del peso molecular (Log PM) de las bandas correspondientes a los patrones. Se calculó una regresión lineal para estos datos. Se muestra la ecuación y el coeficiente de correlación del ajuste.

### 3.11. Análisis estadístico

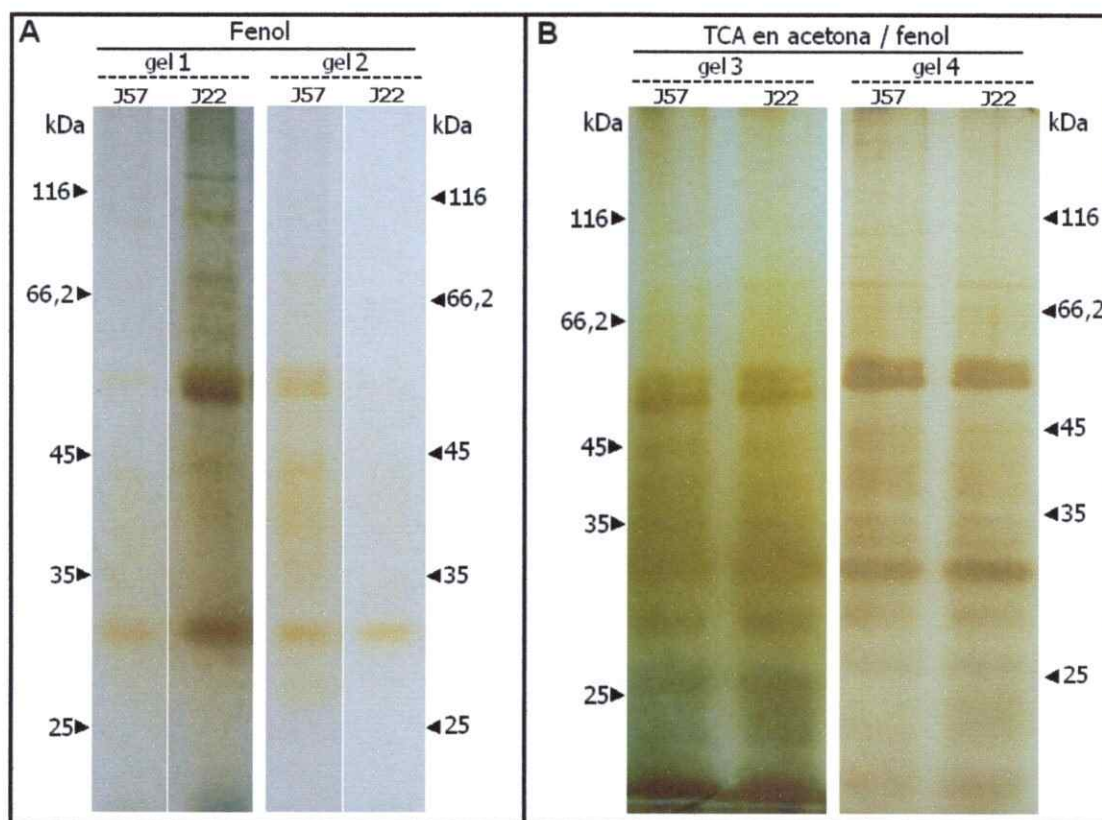
Los porcentajes de volumen de cada una de las manchas, obtenidas a partir del análisis de las imágenes, se normalizaron mediante el método de auto-escalado (van den Berg y col, 1996), la cual consiste en restarle a cada uno de los porcentajes de volumen, el promedio de este en todos los geles y luego se divide por la desviación estándar. Así, los valores negativos representan porcentajes de volumen inferiores al promedio de esa mancha en todas las muestras. Estos datos se ingresaron a un programa de análisis estadístico (MultiExperiment Viewer v.4.3; disponible en [www.tm4.org](http://www.tm4.org)) y se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), utilizando un  $p=0,01$ . A partir de este análisis, con las manchas que presentaron diferencias significativas entre las muestras, se confeccionó un agrupamiento jerárquico mediante un criterio de unión, el ligamiento medio ponderado y, como métrica, la distancia de Manhattan. Para comparar los distintos promedios de las manchas significativos se realizó un ANOVA seguido por una prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95%, para lo cual se utilizó el programa XLSTAT v.2009.3.01 (disponible en [www.xlstat.com](http://www.xlstat.com)).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Optimización de la extracción de las proteínas**

Para poder comparar perfiles proteicos de dos condiciones distintas, es indispensable realizar la separación de las proteínas de manera reproducible y así poder concluir que las diferencias se deben a una abundancia diferencial de las proteínas y no a la variabilidad presente en los tratamientos metodológicos. Por lo tanto es sumamente importante evaluar todas las muestras en un gel de SDS-PAGE y así verificar la calidad de la cuantificación y la presencia de impurezas.

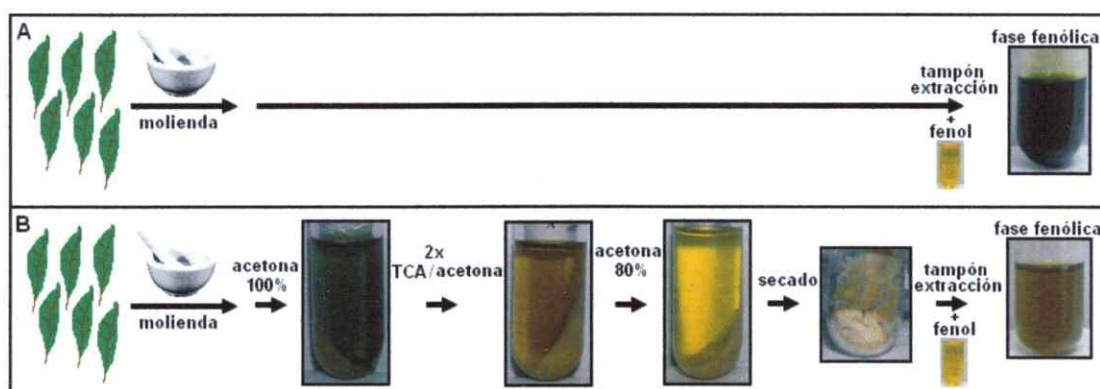
La hoja del duraznero presenta compuestos fenólicos, lípidos, pigmentos, y polisacáridos. Estos compuestos pudiesen interferir con los métodos de cuantificación y separación de las proteínas (Wang y col, 2003; Wang y col, 2006; Isaacson y col, 2006; Wang y col, 2008). Desafortunadamente los primeros geles de SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida realizados, para evaluar todas las muestras, mostraban distintas intensidades en los distintos carriles, aún cuando de acuerdo al método de cuantificación de las proteínas de Bradford, las concentraciones de las proteínas eran las mismas (Figura 7, A, gel 1). Incluso, al repetir la separación, se encontró que las intensidades relativas, entre las mismas muestras de la proteína, cambiaba (Figura 7, A, gel 2). Además el perfil proteico de las muestras presenta un patrón de bandas poco definido y difuso.



**Figura 7. Evaluación del método de extracción de las proteínas.** Geles de SDS-PAGE (poliacrilamida al 12%) de una dimensión, con muestras de las proteínas de las hojas del duraznero, para evaluar el efecto del tratamiento de la muestra con TCA/acetona (pretratamiento), previo a la extracción de las proteínas. En A, se aprecia que sin pretratamiento dos muestras de proteínas (J57 y J22) muestran distintas intensidades habiéndose cargado igual cantidad de las proteínas según la cuantificación (gel 1). Además, las mismas dos muestras de las proteínas presentan distintas intensidades relativas al ser cargadas en otro gel (gel 2). En B, se muestra que con pretratamiento ambas extracciones presentan similares intensidades (gel 3), incluso al realizar otro gel (gel 4). En el panel A, se cargaron, según la cuantificación, 3  $\mu\text{g}$  de proteínas en cada uno de los carriles. En el panel B, se cargaron en todos los carriles, 5  $\mu\text{g}$  de proteínas, según la cuantificación.

Por esta razón, se implementó un pretratamiento de la muestra (detallado en materiales y métodos, sección 2.3), previo a la extracción de las proteínas que debería permitir la obtención de muestras con menor cantidad de las impurezas (Figura 8). Al utilizar el pretratamiento, las intensidades eran similares entre distintas muestras, al ser cargadas en un gel SDS-PAGE (Figura 7, B, gel 3). Este patrón se repitió al realizar

otro gel en las mismas condiciones (Figura 7, B, gel 4). Este método permitió obtener aproximadamente 250  $\mu\text{g}$  de proteínas a partir de 1,5 g de hojas, con un rendimiento constante para las distintas muestras. Se requieren 5  $\mu\text{g}$  de proteína para separar la muestra mediante SDS-PAGE en una dimensión, 75  $\mu\text{g}$  de proteína por cada una de las 3 replicas de los geles 2D y aproximadamente 2  $\mu\text{g}$  para cuantificar la muestra, dependiendo de la concentración obtenida. En resumen, se requieren como mínimo 232  $\mu\text{g}$  de proteínas a partir de una extracción.



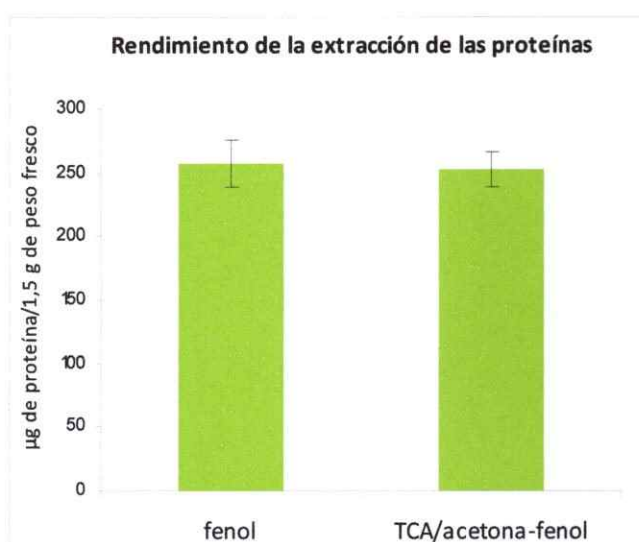
**Figura 8. Disminución de los pigmentos en la muestra debido al tratamiento con TCA/acetona.** Sin el pretratamiento con TCA/acetona (A), la muestra de las hojas es molida e inmersa en un amortiguador de extracción y fenol (de color amarillo), la mezcla es agitada vigorosamente y centrifugada para separarla en 2 fases. Las proteínas se encuentran en la fase fenólica, esta solución presenta un color verde. Con el pretratamiento con TCA/acetona (B), las hojas molidas son tratadas con acetona al 100%, TCA al 10% en acetona (2 veces), acetona al 80% y dejadas secar a temperatura ambiente. Al sedimento seco, se le agrega tampón de extracción y fenol, se agita y se centrifuga (ver materiales y métodos sección 2.3). Esto permite extraer pigmentos que pueden interferir con los procedimientos posteriores. Como se observa en B, la fase fenólica presenta un color mucho más claro que en A.

Una vez implementado el método de extracción de las proteínas mediante lavados con TCA/acetona seguido de una extracción fenólica, se evaluó el rendimiento de este protocolo y se comparó con una extracción fenólica simple (Tabla 1). Se encontró que el rendimiento no disminuyó significativamente al utilizar lavados con TCA/acetona antes de realizar la extracción fenólica (Figura 9).

**Tabla 1. Rendimientos de obtención de las proteínas.** Se muestran los resultados de la cuantificación de proteínas de 6 extracciones independientes de una misma muestra de hojas de duraznero. 3 de ellas se realizaron sometiendo la muestra a una extracción fenólica de proteínas. Las otras 3 se realizaron con un tratamiento con TCA/acetona (se detalla en materiales y métodos, sección 2.3) seguido de una extracción fenólica. Se muestran las concentraciones de proteína de las muestras, el volumen obtenido y la masa total de proteínas.

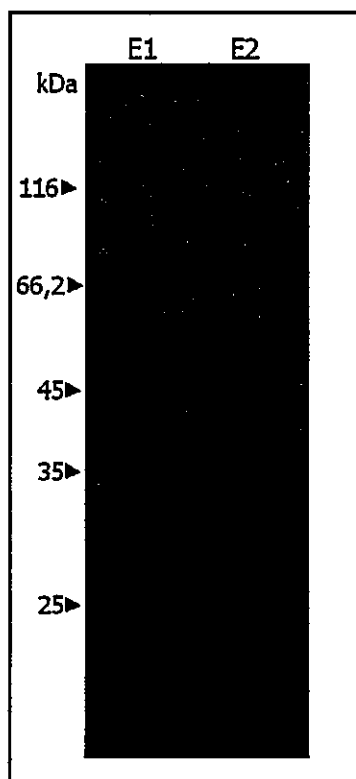
Tratamiento de la muestra*	Concentración [ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Masa total de proteína [ $\mu\text{g}$ ]	Promedio [ $\mu\text{g}$ ]	Desviación estándar [ $\mu\text{g}$ ]
fenol	1,61	210	237	257	19
fenol	1,13	168	266		
fenol	1,41	185	261		
TCA/acetona-fenol	1,17	215	252	252	14
TCA/acetona-fenol	1,25	170	274		
TCA/acetona-fenol	1,58	190	238		

\*en todos los casos se utilizaron 1,5 g de peso fresco de hojas de duraznero.



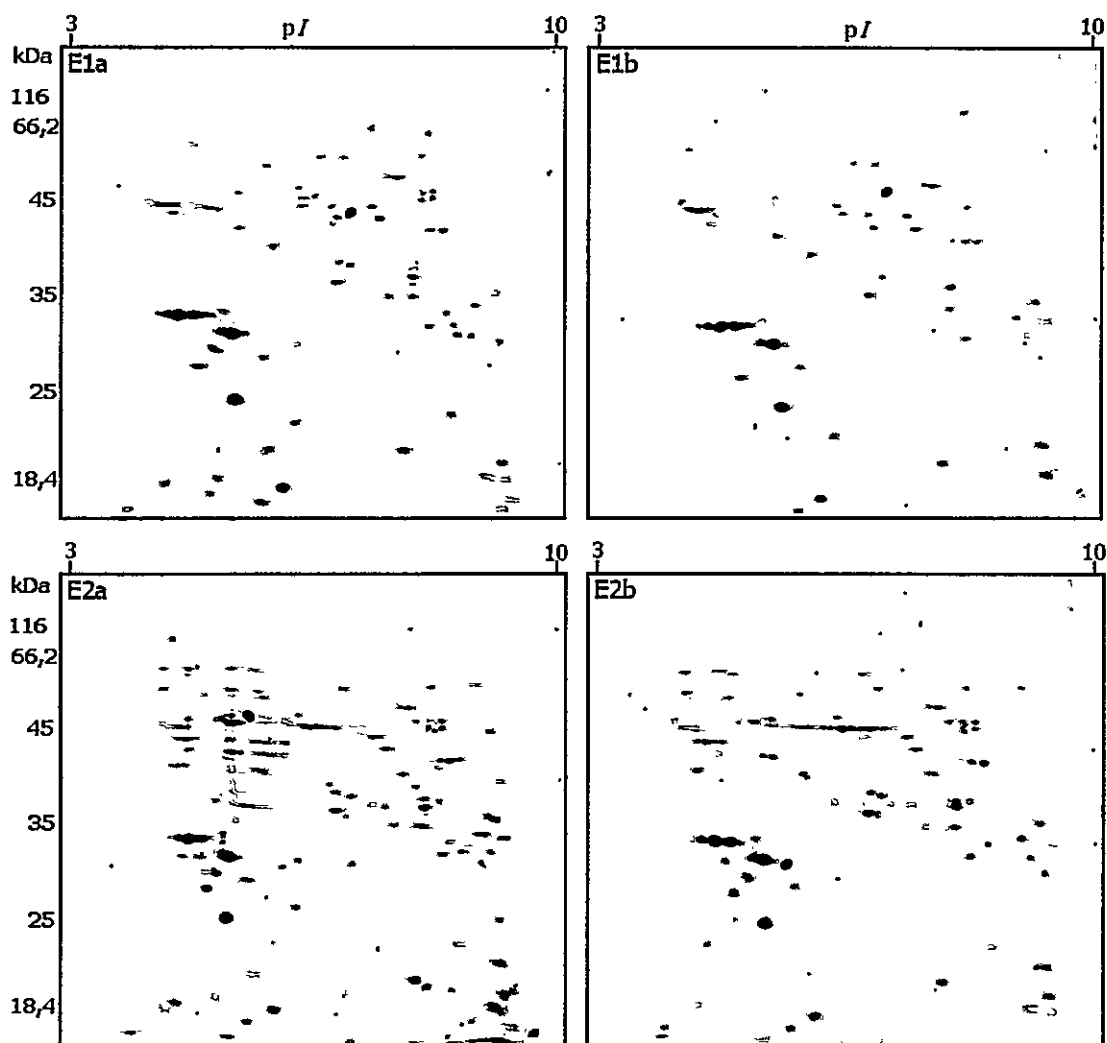
**Figura 9. Evaluación del rendimiento de la obtención de las proteínas al remover interferentes antes de realizar la extracción.** Se muestran los promedios de los rendimientos de proteínas de 3 experimentos independientes, con sus respectivas desviaciones estándar, a partir de una misma muestra biológica. Al utilizar los lavados con TCA/acetona, previos a la extracción de las proteínas, no se encontró una disminución significativa en el rendimiento de obtención de proteínas (t-student).

Una vez optimizada la extracción de las proteínas se procedió a realizar los geles 2-D (ver Figura 2). Se evaluó la reproducibilidad mediante replicas técnicas para la extracción de las proteínas (E1 y E2) y para la generación de los geles 2D. Se cuantificó la concentración de las proteínas y se separaron 5  $\mu\text{g}$  de proteínas de cada extracción, mediante SDS-PAGE con poliacrilamida al 12% (Figura 10).



**Figura 10. Evaluación de las extracciones de las proteínas para la estandarización.** Las proteínas provienen de la muestra VF2-17B112-72 (Anexo 1) y se separaron mediante SDS-PAGE 12%. Se observa un patrón de bandas bien definido y de igual intensidad en ambos carriles. E1 y E2 corresponden a las réplicas técnicas de la extracción de proteínas. En los dos carriles se cargaron 5  $\mu$ g de proteínas.

Se observó un perfil bien definido e igual intensidad en ambas muestras (Figura 10). Con la certeza de que la extracción y la cuantificación de las proteínas se había realizado de manera exitosa, se decidió proceder a resolverlas en los geles 2-D. Para esto, se separaron las muestras por IEF y luego mediante SDS-PAGE al 12% en geles de 17 x 17 cm. Esto se hizo en duplicado para cada una de las 2 extracciones (Figura 11).



**Figura 11. Geles bidimensionales de las réplicas técnicas.** Separación de las proteínas extraída de la muestra VF2-17B112-72 (Anexo 1). Los geles fueron hechos a partir de dos extracciones independientes de una misma muestra biológica (réplicas técnicas E1 y E2), de las cuales se hicieron réplicas técnicas para confeccionar los geles (E1a, E1b, E2a y E2b).

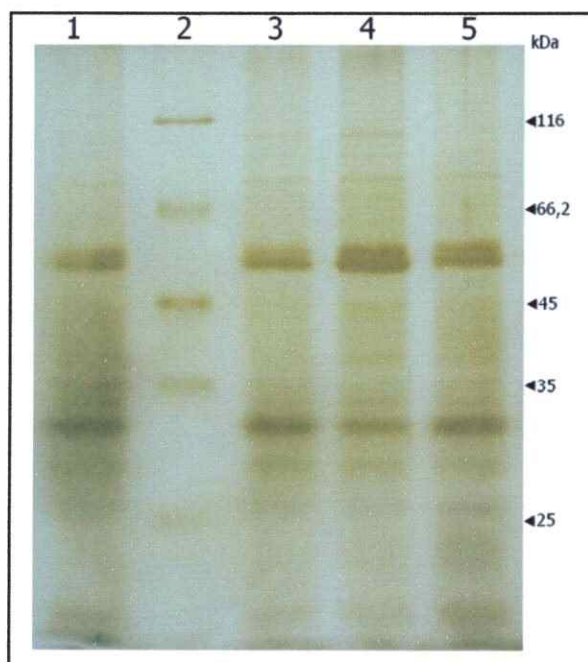
Se detectaron, preliminarmente, más de 500 manchas en cada uno de los geles. Las imágenes de las réplicas técnicas se analizaron digitalmente y la reproducibilidad para la separación de proteínas fue de 95% (manchas correspondidas/total de manchas) y para la extracción de las proteínas, de 98%. Por lo tanto este procedimiento es



compatible para la generación de geles 2D para los estudios proteómicos, a partir de los extractos de las proteínas provenientes de las hojas de duraznero.

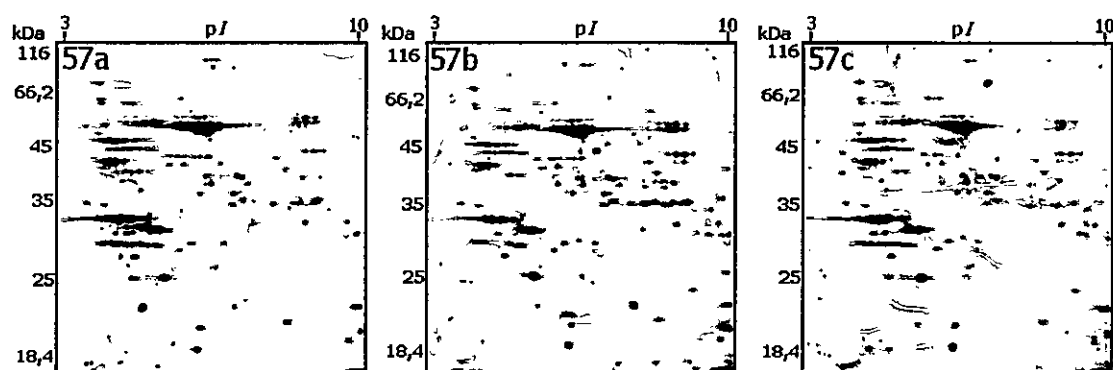
#### 4.2. Proteómica diferencial de las hojas

De acuerdo a la estrategia expuesta en los materiales y métodos, se procedió a analizar las muestras J57, J36, J22 y H. Para esto se extrajeron, con el pretratamiento, las proteínas solubles de cada una de las muestras, se cuantificaron y, mediante un gel de SDS-PAGE al 12%, se evaluó la calidad de esta medición y el efecto de los compuestos potencialmente interferentes (Figura 12). Es posible observar intensidades similares entre las distintas muestras, incluso al realizar otro gel (dato no mostrado). Además las proteínas presentan un patrón definido.



**Figura 12. Separación de las proteínas obtenidas a partir de las hojas de las distintas muestras del duraznero.** Se utilizó un gel de SDS-PAGE al 12%. Carril 2, se cargaron 0,3-0,6  $\mu\text{g}$  de marcador de peso molecular. En el resto de los carriles se cargaron 5  $\mu\text{g}$  de proteínas. Carril 1, muestra H; carril 3, muestra J36; carril 4, muestra J57; carril 5, muestra J22.

Como se puede apreciar, el perfil de expresión proteica entre las distintas muestras es similar, sin embargo la resolución de las proteínas mediante esta técnica no permite determinar cambios significativos en los niveles de éstas. Por lo tanto, se procedió a generar geles 2-D para cada una de las muestras con tres réplicas técnicas, las cuales fueron analizadas digitalmente (ver materiales y métodos, sección 2.10). Como ejemplo, en la Figura 13 se muestran los tres triplicados de la muestra J57. Asimismo, se realizaron triplicados para las muestra J36, J22 y H (anexo 2).



**Figura 13. Triplicados de Geles 2D para la muestra J57.** Para cada una de las muestras analizadas (J57, J22, J36 y H) se confeccionaron 3 geles bidimensionales como réplicas técnicas. De esta manera se pudo evaluar la reproducibilidad de la separación. Aquí se muestran los triplicados (57a, 57b y 57c) para la muestra 57J. A la izquierda de cada imagen se muestran los valores de los pesos moleculares. Se cargaron 75  $\mu$ g de proteínas en cada uno de los geles. El resto de los geles se muestra en el Anexo 2.

En Figura 14 se muestran 4 geles correspondientes a la réplica "b" de cada una de las muestras.

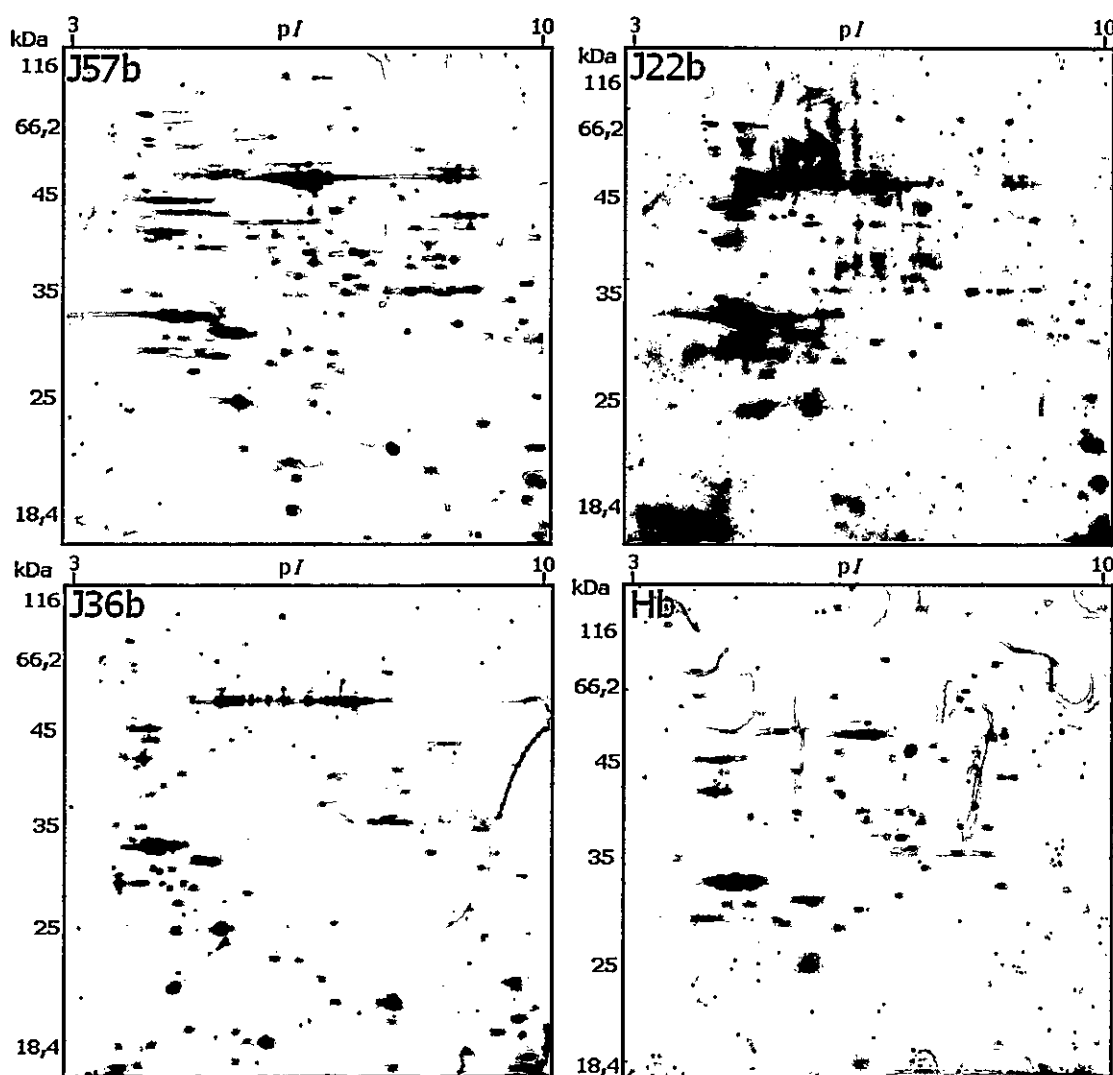
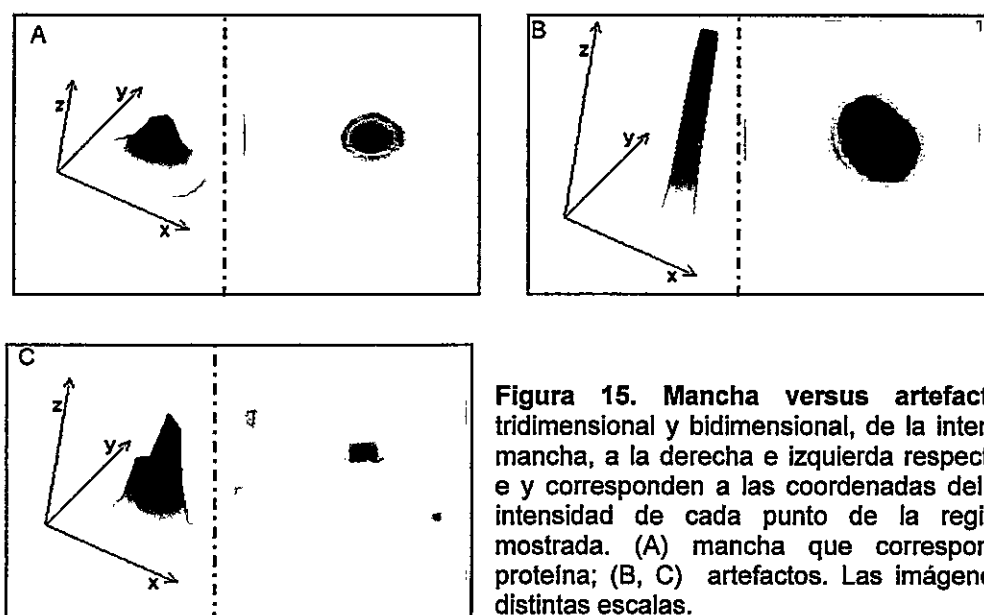


Figura 14. Réplica b de geles 2D para cada una de las muestras. Para cada una de las muestras analizadas (J57, J22, J36 y H) se realizaron geles 2D en triplicado (a, b y c). Aquí se muestra la réplica "b" para cada una de la muestras. Se cargaron 75  $\mu\text{g}$  de proteínas en cada uno de los geles. El resto de los geles se muestra en el Anexo 2.

#### 4.3. Análisis de geles 2D y de las manchas presentes.

En el gel de fusión TOTAL (ver sección 3.10), se detectaron automáticamente 630 manchas de acuerdo a un radio mínimo de 5 píxeles y una sensibilidad del 20%. Se utilizó un modelo matemático para determinar la forma de cada mancha. Posteriormente se revisó manualmente cada una de las manchas y se filtró de acuerdo

a la presencia de estas en los triplicados y la imagen tridimensional de la intensidad (Figura 15). Se eligieron las manchas que, al graficar la coordenada  $z$  versus la coordenada  $x$  o  $y$ , mostraron una curva gaussiana (Rogers y col, 2003).



**Figura 15. Mancha versus artefacto.** Imagen tridimensional y bidimensional, de la intensidad de la mancha, a la derecha e izquierda respectivamente.  $x$  e  $y$  corresponden a las coordenadas del gel;  $z$ , a la intensidad de cada punto de la región del gel mostrada. (A) mancha que corresponde a una proteína; (B, C) artefactos. Las imágenes están en distintas escalas.

Producto de los filtros automáticos y manuales, resultaron 145 manchas que fueron sobrepuestas virtualmente a cada uno de los geles y fueron analizadas estadísticamente. Se evaluó la variabilidad de las manchas entre los triplicados técnicos y luego entre las distintas muestras. Se encontraron 23 manchas (16%) que varían significativamente en las distintas muestras con, al menos, un 99% de confianza. En la Tabla 2 se muestran los promedios, en las distintas muestras, de los porcentajes de volumen normalizados, sus respectivas desviaciones estándar, el grado de significancia, y el punto isoeléctrico experimental y el peso molecular experimental de la proteína correspondiente a cada mancha.

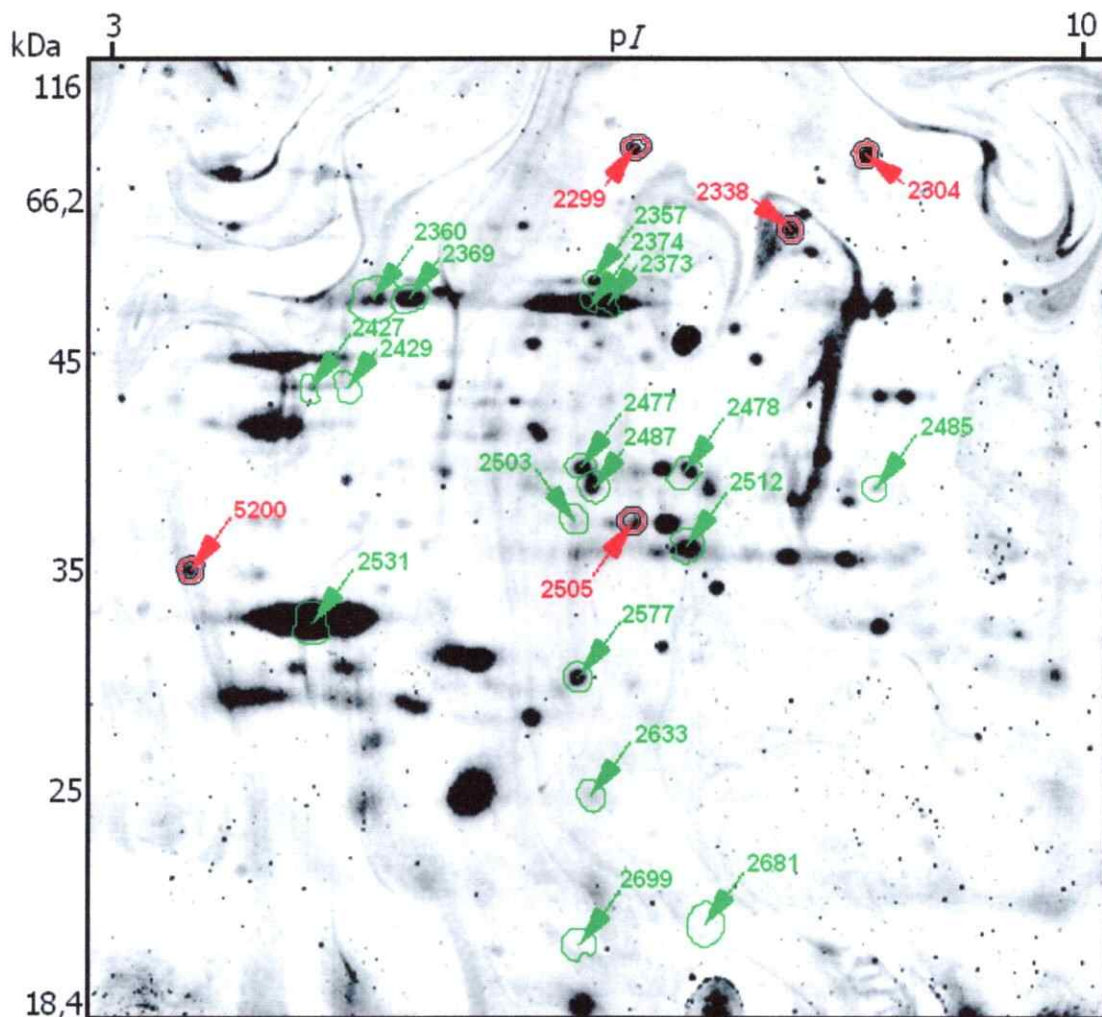
**Tabla 2. Manchas que cambian significativamente en las muestras.** De las 145 manchas, se encontraron 23 (16%) que presentan diferencias significativas entre las distintas muestras (ANOVA;  $p=0,01$ ). ID, número de identificación. Prom, promedio de la muestra del % de volumen normalizado. DE, desviación estándar ( $n=3$ ).  $p/_{exp}$ , punto isoeléctrico experimental.  $PM_{exp}$ , peso molecular experimental.

Mancha ID	Prom. J57	DE	Prom. J36	DE	Prom. J22	DE	Prom. H	DE	$p/_{exp}$	$PM_{exp}$
2299*	-0,79	0,08	-0,61	0,3	0	0,5	1,4	0,85	6.1	97,6
2304**	-0,58	0,1	-0,41	0,28	-0,55	0,13	1,54	0,81	7.6	83
2338**	-0,57	0,12	-0,71	0,14	-0,28	0,36	1,55	0,6	6.8	65,3
2357*	1,43	0,36	-0,3	0,84	-0,25	0,33	-0,88	0,31	6.0	56,6
2360*	0,65	0,58	-0,85	0,64	1,02	0,62	-0,83	0,17	5.5	53
2369*	1,02	0,52	-0,93	0,26	-0,8	0,07	0,71	0,77	5.7	54,2
2373*	1,11	0,45	-1,22	0,32	0,38	0,19	-0,28	0,86	5.9	50,8
2374*	1,26	0,28	-0,53	0,89	0,3	0,25	-1,03	0,27	6.0	51,5
2427*	0,39	0,46	1,17	0,92	-1,03	0,15	-0,53	0,33	5.2	44,8
2429	1,2	0,67	0,25	0,39	-1,06	0,31	-0,38	0,81	5.4	44,7
2477*	1,02	0,59	-1,27	0,51	0,43	0,69	-0,19	0,33	6.0	39,4
2478	1,39	0,56	-0,21	0,25	-0,88	0,88	-0,3	0,29	6.2	39,1
2485*	1,45	0,84	-0,7	0,04	-0,22	0,63	-0,53	0,1	7.7	38,5
2487	1,37	0,84	-0,91	0,17	-0,28	0,52	-0,19	0,52	6.0	38,3
2503*	1,4	0,69	-0,9	0,18	-0,14	0,5	-0,36	0,58	5.9	37
2505*	-0,66	0,39	-0,62	0,07	-0,22	0,57	1,5	0,56	6.1	37,3
2512	0,36	0,35	-0,61	0,39	-0,95	0,27	1,2	0,93	6.2	36,1
2531	-1,43	0,22	0,33	0,04	0,5	0,34	0,59	1,1	5.1	32,5
2577	-1,24	0,26	-0,2	0,34	1,07	0,71	0,37	0,73	6.0	29,7
2633	-0,03	0,46	1,32	0,31	-0,35	0,58	-0,94	0,85	6.1	25,2
2681*	-0,46	0,42	1,49	0,51	-0,49	0,64	-0,54	0,42	6.4	21,0
2699*	1,44	0,27	-0,04	0,69	-0,9	0,2	-0,49	0,47	6.0	20,1
5200	-0,16	0,4	-0,64	0,57	-0,63	0,62	1,42	0,61	4.6	35,3

\* Mancha con un valor p entre  $5 \cdot 10^{-3}$  y  $10^{-3}$

\*\* Mancha con un valor p inferior a  $10^{-3}$

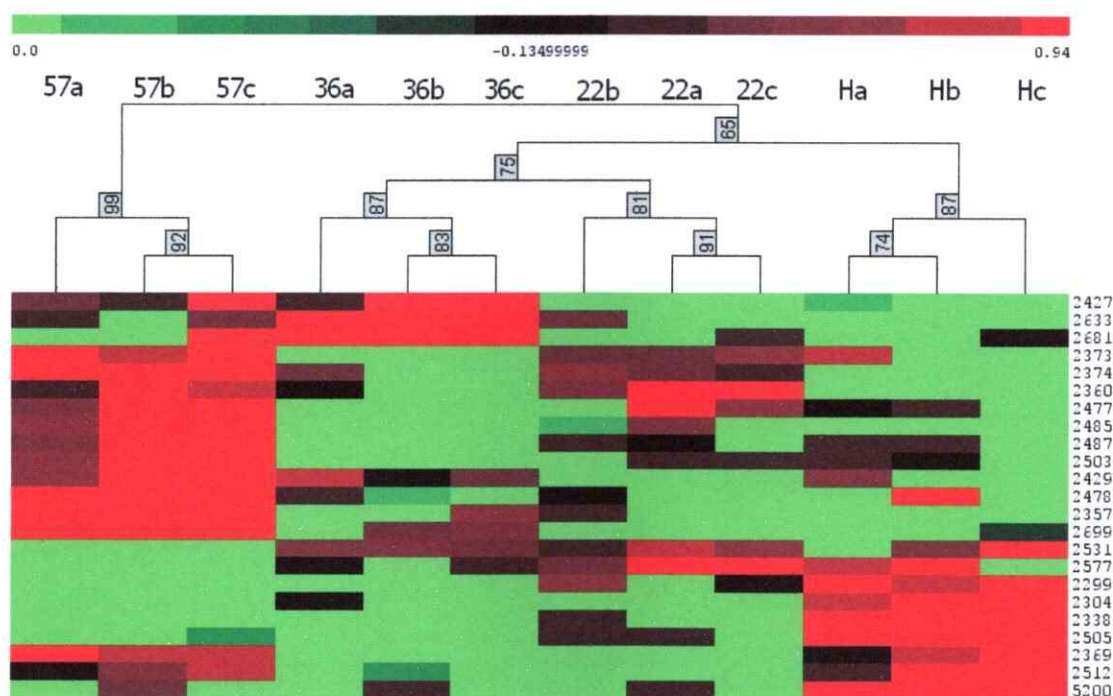
En la Figura 16 se pueden apreciar las 23 manchas recién mencionadas en el gel 2D de la muestra H (réplica b). Las manchas se enmarcan y se señalan con una flecha y el número de identificación. En rojo se muestran las 5 manchas que son significativamente más abundantes en la muestra H respecto a las demás.



**Figura 16. Manchas que cambian significativamente entre las muestras.** Se puede apreciar la réplica "b" del gel 2D de la muestra H. Se señalan 23 manchas con una variabilidad estadísticamente aceptable entre las distintas réplicas de cada una de las muestras y, además, una expresión diferencial entre las distintas muestras. Éstos se enmarcan y se indican con una flecha y su número de identificación. En rojo, se exhiben los que son significativamente más abundantes en la muestra H respecto a las otras. Se cargaron 75  $\mu$ g de proteínas.

Se realizó un agrupamiento jerárquico que ordena en grupos a los distintos gels de acuerdo a la similitud entre ellos, considerando las 23 manchas significativas. Este análisis aporta información respecto a la reproducibilidad de las réplicas técnicas, aunque no brinda información biológica (ver discusión). Este procedimiento iterativo conduce a la formación de un dendrograma (Figura 17), donde todos los grupos

quedan conectados. El árbol jerárquico se construyó con un *bootstrap* de 1000. Como se aprecia en la Figura 17, cada uno de los triplicados técnicos, de una muestra, quedó dentro de un mismo grupo. A su vez, la muestra J36 quedó agrupada con la J22, y éstas con la muestra H. La muestra J57 quedó como un grupo externo.



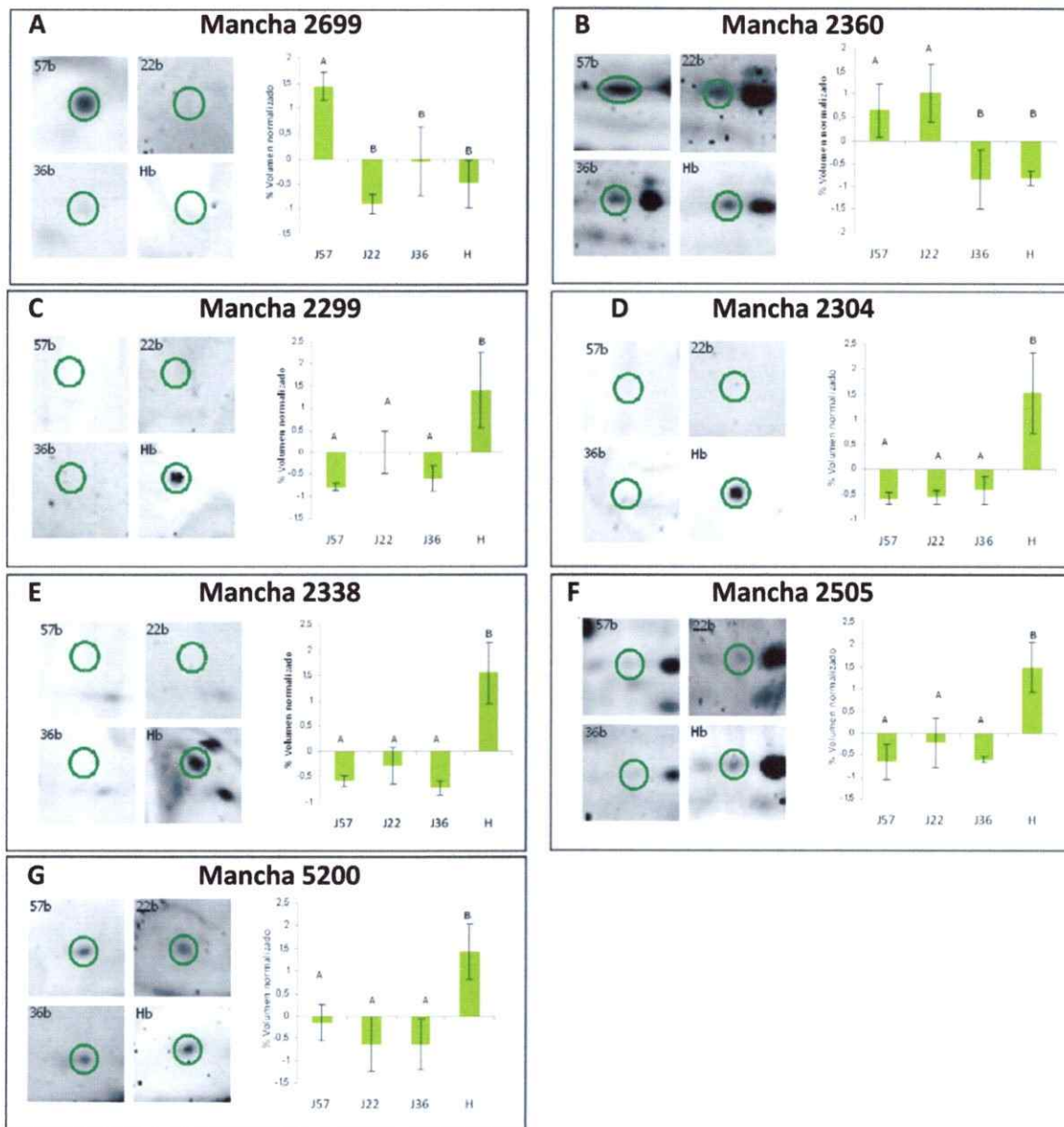
**Figura 17. Reproducibilidad de las réplicas técnicas.** Agrupamiento jerárquico que junta a los distintos geles de acuerdo a su similitud. El dendrograma fue construido mediante un proceso que itera hasta que todos los geles se encuentran relacionados. La métrica empleada fue la distancia de Manhattan. Se utilizó un ligamiento medio. El *bootstrap* ocupado fue de 1000. En la base de cada rama se muestran los valores de *bootstrap support*. Sobre el agrupamiento, se muestra la escala de % de volumen normalizado.

El agrupamiento jerárquico utilizado, consiste en un método aglomerativo, en el cual se agruparon los 12 objetos (geles) en un solo grupo. El procedimiento consta de sucesivos estados de análisis. En cada estado se agrupan los pares de objetos que presentan mayor similitud entre ellos (Manning, 2008). Por esta última razón es que, en todos los casos, quedó un triplicado separado de los otros dos, pero todas las réplicas quedaron juntas en el siguiente estado de análisis.

Además, en la parte inferior derecha del dendrograma se puede apreciar que hay manchas con intensidades superiores en la muestra H, respecto a las muestras J57, J36 y J22. Esto resulta ser de gran interés, por cuanto, son manchas que corresponden a potenciales marcadores para el fenotipo de susceptibilidad a la harinosidad de los frutos, aunque no se encontró un potencial marcador proteico específico para el fenotipo de jugosidad.

Ya se mostró que hay manchas con diferencias entre las muestras, pero para determinar cuáles son las muestras en la que esas manchas presentan diferencias, se realizó un análisis de los promedios de los porcentajes de volumen normalizados en las distintas muestras (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey (Figura 18). De esta forma se encontró una mayor expresión en la muestra J57 respecto a las demás para la mancha 2699 (Figura 18, A), y mayor expresión en la muestras J57 y J22 respecto a las J36 y H para la mancha 2360 (Figura 18, B). Además se encontraron 5 manchas que presentan una expresión significativamente mayor en la muestra H respecto al resto de las muestras, en donde el nivel de expresión fue el mismo (Figura 18, C-G). Estas son las manchas 2299, 2304, 2338, 2505 y 5200. En el panel E de la Figura 18, se pueden apreciar 2 manchas, presentes en la réplica Hb, que se encuentran muy cerca de la mancha enmarcada. Aparentemente muestran el mismo patrón de expresión que la mancha 2338, pero al ser analizadas se encontró que la variabilidad de estas manchas a lo largo de los triplicados era muy grande y eso las invalida como manchas significativas.





**Figura 18. Manchas con expresión diferencial significativa.** En cada cuadro se muestra a la izquierda la réplica b de cada una de las muestras y la zona correspondiente a la mancha se delimita en verde. Sobre las imágenes se muestra el número de identificación de la mancha. A la derecha se muestra el promedio de las réplicas del porcentaje de volumen normalizado (ver sección 3.11.) para cada muestra. Las diferencias significativas (ANOVA-Tukey) se señalan con las letras A y B, sobre las barras del gráfico. Así, muestras con la misma letra no presentan diferencia significativa entre sus promedios, y muestras con distinta letra sí la presentan. En A, la mancha 2699 presenta mayor % volumen normalizado en J57 respecto a las otras muestras. En B, la mancha 2360 muestra mayor % volumen normalizado en J57 y J22 respecto a J36 y H. Los recuadros C-G, muestran las manchas 2299, 2304, 2338, 2505 y 5200, respectivamente, todas con % volumen normalizado mayor en H respecto a las demás muestras.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Optimización de la extracción de las proteínas

La preparación de la muestra es un paso crucial para obtener una resolución de las proteínas de alta calidad en los análisis proteómicos. Sin embargo esto se dificulta cuando se trabaja con tejidos vegetales, puesto que presentan una baja concentración de las proteínas, hay compuestos que dificultan la disgregación del tejido y hay una alta concentración de proteasas respecto a otro tipo de material biológico (Isaacson y col, 2006).

En proteómica vegetal, las hojas son consideradas tejidos recalcitrantes, en cuanto a que poseen, además de altas concentraciones de proteasas (Granier, 1988), un alto contenido de polifenoles, polisacáridos, pigmentos y lípidos (Wang y col, 2006). Estos compuestos interfieren tanto en la extracción de las proteínas, como en la cuantificación y en la separación de estas. Por esta razón fue indispensable implementar un protocolo de extracción de las proteínas a partir de las hojas del duraznero, que permitiera obtener una cantidad suficiente de proteínas, de buena calidad y con un grado de pureza que permitiera realizar un análisis de los perfiles proteicos.

En este respecto, se implementó un pretratamiento, un protocolo de remoción de los compuestos interferentes, donde la exclusión de los pigmentos fue evidente al observar los cambios de tonalidad del sobrenadante al realizar este procedimiento (ver Figura 8). De acuerdo a lo descrito previamente, al lavar con TCA al 10% en acetona, también

disminuye la cantidad de lípidos y compuestos fenólicos presentes en la muestra (Wang y col, 2004; Wang y col, 2008). Posterior a esto, se realizó una extracción fenólica de las proteínas, que debería remover los hidratos de carbono y los ácidos nucleicos.

Se decidió no agregar pasos adicionales al procedimiento de extracción de las proteínas, porque se corre el riesgo de perder rendimiento. En este caso podrían haberse perdido proteínas en los sucesivos lavados de la muestra con TCA/acetona, de tal manera que la remoción de pigmentos, lípidos y polifenoles, se viera comprometida con la cantidad total de proteínas obtenidas al final del procedimiento. Por esta razón se cuantificó el rendimiento de la extracción de las proteínas, con y sin la utilización de TCA/acetona. Se vio que la adición de estos pasos al protocolo de extracción no produjo una disminución significativa de la cantidad de las proteínas recuperadas (Figura 9). Sin embargo, a partir de las hojas de *Olea europaea* (olivo) se extrajeron las proteínas mediante fenol y SDS, se alcanzó un rendimiento de 2,49 mg de proteínas/ g de peso fresco (Wang y col, 2003), aproximadamente 15 veces más de lo que obtuvo en este trabajo (240 µg/1,5 g). Por lo tanto, queda el desafío futuro de perfeccionar este método. Para obtener un mejor rendimiento, cabe destacar que la cantidad extraída es suficiente para generar 1 gel de SDS-PAGE de 1 dimensión (5 µg) y 3 geles 2D (75 µg por gel). Además, el método utilizado permitió la cuantificación, resolución y el análisis del patrón proteico de las muestras suficiente para lograr encontrar marcadores proteicos específicos de la harinosidad en las hojas del duraznero (Figuras 17 y 18; ver sección 5.3).

Al separar las proteínas mediante SDS-PAGE de 1 dimensión, aquellas muestras preparadas con TCA/acetona, mostraron patrones uniformes de bandas e intensidades similares entre distintas muestras. Sin embargo, las muestras que fueron preparadas en ausencia de TCA/acetona mostraron patrones de bandas difusos y distintas intensidades entre las muestras (Figura 7). Se ha visto que tanto los lípidos como los pigmentos y polifenoles, pueden interactuar con las proteínas, formando complejos en algunos casos y modificando directamente las proteínas, en otros (Rabilloud 1996). Estas modificaciones podrían haber interferido, tanto en la cuantificación de las proteínas, como en la migración a través del gel de poliacrilamida. De modo que estas interacciones podrían explicar las diferencias observadas en la Figura 7 entre las muestras preparadas con y sin el pretratamiento para remover los interferentes.

Para evaluar la reproducibilidad de los geles bidimensionales, se generaron 4 geles 2D, a partir de una misma muestra biológica. Se realizaron 2 extracciones de proteínas, con el tratamiento previo de TCA/acetona, y 2 geles 2D a partir de cada extracción. De esta forma se evaluó la reproducibilidad (manchas correspondidas/total de manchas) tanto de las réplicas para las extracciones como para la separación de las proteínas, con un 95 y 98%, respectivamente. Así, se demostró que esta metodología es adecuada para analizar distintos perfiles proteicos de las hojas del duraznero.

## **5.2. Proteómica diferencial de las hojas**

Al realizar la separación de las muestras mediante SDS-PAGE de 1 dimensión (Figura 12), se encontraron intensidades similares entre los carriles, ausencia de interferentes en el fondo y un patrón de bandas similar y bien definido en las todas muestras. La

RUBISCO (ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa), enzima muy abundante en el tejido foliar debido a la alta actividad fotosintética (Saha y col, 1997), es característica de la fracción proteica de las hojas de muchas especies. Las subunidades mayor y menor de esta enzima han sido descritas en tejidos de la planta de algodón (*Gossypium sp.*), con 49 y 14 kDa de peso molecular, respectivamente (Saha y col, 1997). En la Figura 12, se puede apreciar una banda bien marcada de aproximadamente 50 kDa, la cual podría corresponder a la subunidad mayor de la RUBISCO. La subunidad menor no alcanza a distinguirse. También se puede observar, en todas las muestras, una banda de aproximadamente 30 kDa. Se ha descrito que, al separar la fracción proteica de las hojas de *Olea europaea* (olivo) mediante SDS-PAGE, hay una conspicua banda de 29 kDa (García y col, 2000). Esta banda sobresale más claramente en las hojas juveniles respecto a las hojas adultas. Esto concuerda con la banda observada en la Figura 12 y con la temprana edad fenológica de las hojas utilizadas. Además, tanto en *Arabidopsis thaliana* como en *Spinacia oleracea* (espinaca), los extractos crudos de los cloroplastos poseen un contenido relativamente abundante de anhidrasa carbónica (Salvucci y col, 1987). Esta enzima, un hexámero de 180 kDa (Pocker & Joan, 1973), cumple un rol importante en la fotosíntesis, al aumentar la disponibilidad de anhídrido carbónico en los cloroplastos. Esta evidencia nos sugiere que la banda de 30 kDa presente en las 4 muestras podría corresponder a la anhidrasa carbónica. Estos datos no nos dan información de la identidad exacta de estas bandas, sin embargo son un fuerte indicio de que los extractos proteicos se encuentran en buen estado.

Se realizaron geles 2D para las 4 muestras en estudio y se sometieron a un acucioso análisis, automático y manual, para identificar las manchas. Producto de lo cual se encontraron 145 manchas. Hasta la fecha, se han hecho muy pocos estudios

proteómicos de las hojas, principalmente debido a la elevada abundancia relativa de las proteínas fotosintéticas (e.g. RUBISCO), que impiden visualizar proteínas menos abundantes (Wang y col, 2003), y a la presencia de altos contenidos de proteasas y compuestos interferentes, como ya se ha mencionado. Al analizar los perfiles proteicos de las hojas de vid (*Vitis vinifera*), mediante geles 2D, se encontraron 436 manchas (Sauvage y col, 2007) y en las hojas de arroz (*Oryza sativa*), se encontraron aproximadamente 300 manchas (Shao y col, 2008). Sin embargo en los geles bidimensionales confeccionados a partir de las hojas de olivo, se encontraron tan sólo 160 manchas (Wang y col, 2003) debido al alto contenido de compuestos fenólicos en las hojas de esta especie (Wang y col, 2008). De esta manera, la cantidad de manchas obtenidas en este seminario de título, se encuentra dentro del mismo orden de magnitud que los encontrados en los estudios previos (ver proyecciones).

Al evaluar los geles 2D a simple vista, se puede ver que se obtuvo una buena cantidad de manchas que se distribuyeron a lo largo de la mayoría del gel. No se encontraron líneas verticales, normalmente debido a la presencia de distintos estados de plegamiento de las proteínas, producto de una mala elección de las condiciones de equilibrio de la tira (ver sección 3.8.2.). Las líneas horizontales son mucho más frecuente y puede ser causado por diversas razones como la presencia de compuestos interferentes, condiciones de isoelectroenfoque inadecuadas, reoxidación de los puentes de disulfuro debido al agotamiento de DTT, sobrecarga de las proteínas y otras (Bio Rad, 2009). Sin embargo, casi no apreciamos líneas horizontales en los geles 2D, obteniéndose manchas bien definidas. También se puede observar, que en la parte superior de los geles, se encuentra una cantidad muy reducida de manchas (Figuras 13 y 14). Esto podría deberse al alto contenido de proteasas de la muestra,

respecto a otros tejidos vegetales. De modo que, a pesar de todas las precauciones tomadas comúnmente para otro tipo de tejidos, hubo cierta cantidad de actividad proteolítica que impidió evidenciar proteínas de alto peso molecular. Probablemente esto ocurrió cuando las muestras de hojas estaban molidas, siendo transferida a los tubos de centrifugación y aún sin tampón de extracción.

Como se puede apreciar en los geles 2D, una gran cantidad de manchas se ubicó en la parte central. Esto demuestra que la utilización de tiras con gradiente de pH no lineal fue la apropiada. Si se hubiese empleado un gradiente de pH lineal, las manchas ubicadas al centro del gel, hubiesen estado más juntas y se habría perdido poder resolutivo.

### **5.3. Análisis de geles 2D y manchas.**

Los porcentajes de volumen de cada uno de las manchas, se convirtieron de acuerdo al método auto-escalado (ver sección 3.11.). Luego, se evaluó la variabilidad entre los triplicados y entre las muestras mediante un análisis de la varianza, filtrando todas aquellas manchas que presentaron una alta variabilidad entre los triplicados y/o que no presentaron cambios significativos entre alguna de las muestras, ya que el objetivo principal es encontrar expresión diferencial. De esta manera, de las 145 manchas analizadas, 23 cumplieron con estas condiciones (Tabla 2).

El peso molecular<sub>exp.</sub> (39,1 kDa) y el  $pI_{exp.}$  (6,2) de la mancha 2478 coinciden con los datos publicados para la endopoligalacturonasa (EC 3.2.1.15) de *Prunus persica* (41 kDa y 6,2), calculados a partir de la secuenciación de la proteína (Saffie, 2005). La diferencia en los pesos moleculares se podría deber al error relativo que conlleva la

estimación a partir de los geles 2-D. El transcrito que codifica para esta enzima, se ha visto aumentado en menor cantidad en los frutos que desarrollan la harinosidad (González-Agüero y col, 2008). Sin embargo, no se encontraron niveles diferenciales de esta mancha en las dos condiciones de estudio (Tabla 2).

La mancha 2505, está mayormente expresada en la muestra H, respecto a las J (Figura 18, F). De acuerdo al peso molecular<sub>exp.</sub> (37,3 kDa) y el  $pI_{exp}$  (6,1) mostrados en la Tabla 2 y datos de geles 2D (35 kDa y 6,1) de frutos de *Prunus persica* (Saffie, 2005), esta mancha podría corresponder a una proteína de respuesta a estrés por ácido abscísico (ASR). Los miembros de esta familia de proteínas son codificados por secuencias con alta identidad entre ellas, las cuales se ha visto que se expresan durante el proceso de maduración de frutos y bajo diferentes condiciones de estrés como frío, presión osmótica y tratamiento con ácido abscísico (Padmanavhan y col, 1997; Vaidyanathan y col, 1999). El rol que juegan las proteínas ASR en el proceso de la maduración no está aún bien definido.

Con los datos de estas 23 manchas, se confeccionó un dendrograma (Figura 17), en el cual se aprecia que todos los triplicados fueron agrupados juntos. Esto era lo esperable, para geles confeccionados a partir de una misma muestra, y da cuenta de una buena ejecución de la separación de proteínas. Se puede observar en el dendrograma (Figura 17) que las muestras J22 y J36 agruparon junto con la muestra H, y la muestra J57 quedó como un grupo externo. A simple vista pareciera que hubo un error en el agrupamiento o en la preparación de los geles 2D, puesto que todas las muestras que comparten una característica, en este caso jugosidad de frutos, deberían agrupar juntas. Sin embargo, este ordenamiento es perfectamente plausible.



La agrupación se realizó de acuerdo a la similitud entre los geles, del perfil de expresión de las 23 manchas. Estas manchas podrían estar relacionadas con funciones muy diversas y probablemente, pocas o ninguna, tengan relación directa con el fenotipo de la susceptibilidad a la harinosidad en los frutos. Por lo tanto, el agrupamiento jerárquico muestra la alta reproducibilidad de las réplicas técnicas, pero no entrega información biológica.

En el proyecto Genoma 2, en el cual se enmarca este estudio, se busca encontrar, en las hojas, los marcadores proteicos para los frutos poco susceptibles a la harinosidad. Por lo tanto, en este seminario de título, el procesamiento de las muestras fue diseñado de tal manera (Figura 3), que se eliminó la variabilidad entre las muestras H, mezclándolas en un solo grupo. De esta manera, se buscan manchas representadas en cada una de las muestras J, pero que no lo estén en la muestra H.

Al determinar en qué muestras varía la expresión de las 23 manchas seleccionadas en la Tabla 2, no se encontró ninguna que diera cuenta de una mayor expresión proteica en todas las muestras J respecto de la muestra H. Se puede observar (Figura 17) un grupo de 11 manchas en la muestra J57 (en rojo), de las cuales una (2699) es significativamente más expresada en esta muestra respecto a las otras (Figura 18, A). Además se encontró una mancha expresada en las muestras J57 y J22 más que en las J36 y H (mancha 2360; Figura 18, B). Esto puede deberse a la variabilidad intrínseca de los individuos. Más interesante aún, se encontraron 5 manchas que consistentemente mostraron una mayor expresión en la muestra H respecto a las demás. Para los fines de un programa de mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares y proteicos, no es necesario conocer la identidad exacta de la

proteína. Es decir, es suficiente saber que su presencia se correlaciona fuertemente con el fenotipo de interés y con tener algún método para detectarla.

No obstante, existe la posibilidad de que la intensidad de estas manchas, se deba a proteínas altamente representadas en sólo uno de los tres grupos utilizados para generar la muestra H (Figura 3). Incluso, es posible que efectivamente las 5 manchas estén representadas en cada una de las 3 muestras que componen el grupo H, y que no lo estén en el resto de los individuos equivalentes, es decir los árboles que producen frutos susceptibles a la harinosidad. Por lo tanto es indispensable realizar estudios posteriores (ver proyecciones) a este seminario de título para evaluar estas hipótesis.

## 6. CONCLUSIONES

- 6.1. Se adaptó y optimizó un método de extracción de las proteínas solubles a partir de las hojas de *Prunus persica*, logrando remover varios compuestos que interfieren en la calidad de las proteínas, su cuantificación y su separación en geles 2D.
- 6.2. Se obtuvieron geles bidimensionales a partir de estos extractos proteicos, con las réplicas técnicas y se obtuvo una cantidad de manchas suficientes para realizar un análisis estadístico.
- 6.3. Se compararon los perfiles proteicos de las hojas de *Prunus persica* que producen los frutos susceptibles a la harinosidad (H) con otros que producen los frutos poco susceptibles a la harinosidad (J). Se encontró una leve variabilidad entre individuos de la misma condición y diferencias más marcadas entre individuos H y J. Esta última resulta ser muy interesante para la generación de los marcadores proteicos, para descartar tempranamente a individuos H, en un programa de mejoramiento genético asistido.

## 7. PROYECCIONES

- 7.1. Mejorar el rendimiento de la extracción de las proteínas. Al aumentar la concentración de proteínas extraídas, se permitirá reducir el volumen de la muestra cargada en el IEF. Como consecuencia, esto reduciría aún más la cantidad de los compuestos interferentes presentes en la separación de proteínas y además se podría obtener un perfil proteico con un mayor número de manchas.
- 7.2. Repetir los mismos análisis con individuos que producen frutos con distintos grados de susceptibilidad a la harinosidad, y no sólo los extremos (anexo 1). Así será posible averiguar si el fenotipo estudiado se relaciona con uno o varios marcador(es) del tipo presente/ausente o, más bien, que está(n) presente(s) en distintos grados de acuerdo a la intensidad del fenotipo. Mediante réplicas biológicas y de hojas de las próximas temporadas se podrá evaluar la estabilidad de los perfiles proteicos, en presencia de distintas condiciones ambientales.
- 7.3. Secuenciar las manchas 2299, 2304, 2338, 2505 y 5200 mediante espectrometría de masa. La identidad de estas proteínas podría dar valiosa información acerca de los mecanismos involucrados en el fenómeno de la harinosidad de duraznos.
- 7.4. En un futuro programa de mejoramiento para generar nuevas variedades con frutos no harinosos, la presencia de estas 5 manchas, sobre todo de 2299, 2304 y 2338 (Figura 18, E-G), las cuales se encuentran efectivamente solamente en la muestra harinosa, podrían servir como marcadores fenotípicos para descartar tempranamente aquellas plántulas que las posean.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Abdi, N., Holford, P. y McGlasson, B.. 2002. Application of two-dimensional gel electrophoresis to detect proteins associated with harvest maturity in stonefruit. *Postharvest Biology and Technology*. **26**: 1-13.

Anderson, R.E., 1979. The influence of storage temperature and warming during storage on peach and nectarine fruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **104**: 459-461.

Ben Arie, R., Lavee, S., 1971. Pectic changes occurring in Elberta peaches suffering from woolly breakdown. *Phytochemistry* **10**: 531-538.

Bio Rad Laboratories. 2009. [On-line] Support about expression proteomics. 2-D Doctor. Disponible en: <http://www.expressionproteomics.com>

Blomberg A., Blomberg, L., Norbeck, J., Fey, S., Larsen, P., Larsen, M., Roepstorff, P., Degand, H., Boutry, M., Posch, A., Görg, A., 1995. Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*. **16**: 1935-1945.

Bradford. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**: 248-254.

Brady, C. 1993. Stone fruit. *En* G. Seymour, J. Taylor y G. Tucker (Eds.), *Biochemistry of Fruit Ripening*. pp. 379-404. Chapman and Hall, London.

Brummell, D.A., Dal Cin, V., Lurie, S., Crisosto, C.H. y Labavitch, J.M., 2004. Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. *J. Exp. Bot.* **55**: 2041-2052.

Crisosto, C.H., Johnson, R.S., DeJong, T. y Day, K.R., 1997. Orchard factors affecting postharvest stone fruit quality. *HortScience*. **32**: 820-823.

Crisosto, C.H., Mitchell, F.G. y Ju, Z. 1999. Susceptibility to chilling injury of peach, nectarine, and plum cultivars grown in California. *HortScience*. **34**: 1116-1118.

Crisosto, C. y Labavitch, J. 2002. Developing a quantitative method to evaluate peach (*Prunus persica*) flesh mealiness. *Postharvest Biology and Technology*. **25**: 151-158.

Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M., Thiellement, H. 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*. **7**: 52-54

de Vienne, D., Leonardi, A., Damerval, C. y Zivy, M. Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to drought-stress responses in maize. 1999. *Journal of Experimental Botany*. **50**: 303-309.

DECOFRUT. 2004. Situación actual y perspectivas de desarrollo de frutales de carozo en la región de O'Higgins. Estudio realizado por DECOFRUT para la Corporación de Fomento a la Producción (CORFO).

Dong, L., Zhou, H., Sonogo, L., Lers, A. Y Lurie, S. 2001. Ethylene involvement in the cold storage disorder of Flavortop nectarine. *Postharvest Biology and Technology*. **23**: 105-115.

García, J., Avidan, N., Troncoso, A., Sarmiento, R. y Laveeb, S. 2000. Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues. *Scientia Horticulturae*. **85**: 271-284.

González-Agüero, A., Pavez, L., Ibáñez, F., Pacheco, I., Campos-Vargas, R., Meisel, Orellana, A., Retamales, J., Silva, H., González, M y Cambiazo, V. 2008. Identification of woolliness response genes in peach fruit after post-harvest treatments. *J Exp. Bot.* **59**: 1973-1986.

Granier, F. 1988. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. **9**: 712-718

Herbert, B., Galvani, M., Hamdan, M., Olivieri, E., MacCarthy, J., Pedersen, S., Righetti, P. 2001. Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: Why, when, and how?. *Electrophoresis*. **22**: 2046-2057.

Hurkman W.J. y Tanaka C.K. 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol* **81**: 802-806.

Isaacson, T., Damasceno, C., Serevanan, R., He, Y., Catalá, C., Saladié, M., Rose, J. 2006. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nature Protocols*. **1**: 769-774.

Kao, S., Wong, H., Chiang, C. y Chen, H. 2008. Evaluating the compatibility of three colorimetric protein assays for two-dimensional electrophoresis experiments. *Proteomics*. **8**: 2178-2184.

King, G.A., Henderson, K.G. y Lill, R.E., 1989. Ultrastructural changes in the nectarine cell wall accompanying ripening and storage in a chilling-resistant and chilling-sensitive cultivar. *N.Z. J. Crop Hort. Sci.* **17**: 337-344.

Laemmli. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.

Layne, D. y Bassi, D. 2008. The Peach: botany, production and uses. Layne, D. y Bassi, D (eds.), *Botany and Taxonomy*. pp 1-37. CAB International, Oxfordshire.

Lill, R.E., O'Donoghue, E.M. y King, G.A., 1989. Postharvest physiology of peaches and nectarines. *Hort. Rev.* **11**: 413-452.

Lurie, S. y Crisosto, C. H. Chilling injury in peach and nectarine. 2005. *Postharvest Biology and Technology.* **37**: 195-208.

Manning, C., Raghavan, P. y Schütze, H. 2008. Hierarchical clustering. *En* C. D. Manning, P. Raghavan y H. Schütze (eds.), *Introduction to Information Retrieval.* pp 377-401. Cambridge University Press, New York.

Morgutti, S., Negrini, N., Nocito, N. N., Ghiani, A., Bassi, D. y Cocucci, M. 2006. Changes in endopolygalacturonase levels and characterization of a putative endo-PG gene during fruit softening in peach genotypes with nonmelting and melting flesh fruit phenotypes. *New Phytology.* **171**: 315-328.

ODEPA. 2008. [On-line]. Estadísticas de la agricultura chilena. Disponible en: <http://www.odepa.cl>. Leído el 10 de Septiembre de 2008.

Okie, W. 1998. Preliminary descriptions of five new peach genes. *Acta Horticulturae.* **465**: 107-110.

Padmanabhan, V., Dias, D. y Newton, R. 1997. Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L) induced by water deficit stress. *Plant Molecular Biology.* **35**: 801-807.

Peace, C.P., Crisosto, C.H. y Gradziel, T.M. 2005. Endopolygalacturonase: a Candidate Gene for Freestone and Melting Flesh in Peach. *Molecular Breeding.* **16**: 21-31.

Pocker, Y. y Joan S. 1973. Plant carbonic anhydrase. Properties and carbon dioxide hydration kinetics. *Biochemistry.* **12**: 5127-5134.

Rabilloud, T. 1996. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis.* **17**: 813-829.

Rogers, M., Graham, J. y Tonge, R. 2003. Statistical models of shape for the analysis of protein spots in two-dimensional electrophoresis gel images. *Proteomics.* **3**: 887-896.

Saffie, C. 2005. Análisis del perfil de acumulación de proteínas durante la maduración postcosecha, en cuatro variedades de duraznos (*Prunus persica*). Tesis de Pregrado, estudiante de Ingeniería en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile.

Saha, S., Callahan, F., Dollar, D. y Creech J. 1997. Effect of Lyophilization of Cotton Tissue on Quality of Extractable DNA, RNA, and Protein. *The Journal of Cotton Science.* **1**: 10-14

Salvucci, M., Werneke, J., Ogren, W. y PORTIS, A. Jr. 1987. Purification and Species Distribution of Rubisco Activase. *Plant Physiol.* **84**: 930-936.

- Sauvage, F., Pradal, M., Chatelet, P. y Tesniere, C. 2007. Proteome changes in leaves from grapevine (*Vitis vinifera* L.) transformed for alcohol dehydrogenase activity. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 2597-2603.
- Shao, C., Liu, G., Wang, J., Yue, C. y Lin, W. 2008. Differential Proteomic Analysis of Leaf Development at Rice (*Oryza sativa*) Seedling Stage. **7**: 1153-1160.
- Teo, G., Suzuki, Y., Uratsu, S., Lampinen, B., Ormonde, N., Hu, W.K., DeJong, T.M. y Dandekar, A.M. (2006) Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. *Proc Natl Acad Sci.* **103**: 18842-18847.
- Tetu, S., Tanz, S., Vella, N., Burnell, J. y Ludwig, M. 2007. The *Flaveria bidentis* beta-carbonic anhydrase gene family encodes cytosolic and chloroplastic isoforms demonstrating distinct organ-specific expression patterns. *Plant Physiol.* **144**: 1316-1327.
- Thiellement, H., Zivy, M. y Plomion, C. 2002. Combining proteomic and genetic studies in plants. *Journal of Chromatography.* **782**: 137-149.
- Vaidyanathan, R., Kuruvilla, S. y Thomas, G. 1999. Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. *Plant Science.* **140**: 21-30.
- van den Berg, R., Hoefsloot, H., Westerhuis, J., Smilde, A. y van der Werf, M. 2006. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics.* **7**:142-154.
- Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A., Sensi, E., Mazzuca, S. y Cresti, M. 2003. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissues containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis.* **24**: 2369-2375.
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M., Sensi, E., Tiberi, P. y Cresti, M. 2004. Removal of lipid contaminants by organic solvents from oilseed protein extract prior to electrophoresis. *Analytical Biochemistry.* **329**: 139-141.
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M. y Cresti, M. 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomics analysis. *Electrophoresis.* **27**: 2782-2786.
- Wang, W., Tai, F. y Chen, S. 2008. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *J. Sep. Sci.* **31**: 2032-2039.
- Wessel D y Flugge Ul. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem.* **138**: 141-143.
- Zhou, H.W., Ben Arie, R. y Lurie, S., 2000. Pectin esterase, polygalacturonase and gel formation in peach pectin fractions. *Phytochemistry.* **55**: 191-195.
- Zhou, H.W., Dong, L., Ben Arie, R. y Lurie, S., 2001. The role of ethylene in the prevention of chilling injury in nectarines. *Journal of Plant Physiology.* **158**: 55-61.



## ANEXO 1

**Tabla anexo 1. Fenotipificación del grado de harinosidad.** Se muestra el grado de susceptibilidad a la harinosidad de los frutos, expresado en términos del porcentaje de jugo liberado por los frutos, después de haber sido sometidos a las condiciones que inducen la harinosidad. Los individuos fueron recolectados en la temporada diciembre 2007 - febrero 2008. Se evaluaron 77 individuos. Las mediciones fueron realizadas por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), La Platina. (), la denominación utilizada en este seminario de título para las muestras.

Linea	% Jugo					Promedio % Jugo	SD % Jugo	Fecha Cosecha
	Fruto 1	Fruto 2	Fruto 3	Fruto 4	Fruto 5			
VF2-15B117-11 (H11)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	18-ene
VF2-15B133-16 (H16)	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,3	0,7	24-ene
VF2-15B182-39 (H39)	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,7	24-ene
VF2-16A120-44	0,0	0,0	2,4	2,1	0,1	0,9	1,2	29-ene
VF2-15B164-30	1,4	0,0	0,0	0,0	5,1	1,3	2,2	24-ene
VF2-17B135-82	0,0	4,3	5,3	0,0	0,0	1,9	2,6	18-ene
VF2-16A137-50	4,0	0,1	0,0	0,0	7,0	2,2	3,2	29-ene
VF2-17B128-79	5,6	1,9	2,7	0,0	2,5	2,5	2,0	24-ene
VF2-17B136-83	11,0	2,5	0,3	6,8	13,5	6,8	5,6	24-ene
VF2-15B165-31	5,4	11,2	0,0	13,7	6,3	7,3	5,3	24-ene
VF2-17B155-88	0,0	15,7	6,8	15,5	0,0	7,6	7,8	24-ene
VF2-17B143-85	0,0	0,0	6,3	23,5	8,9	7,7	9,7	24-ene
VF2-16A116-42	16,3	9,6	7,1	3,9	2,5	7,9	5,5	07-ene
VF2-16A141-52	7,7	15,1	11,8	10,1	0,0	9,0	5,7	07-ene
VF2-17B158-90	5,6	17,3	11,2	0,0	11,0	9,0	6,5	09-ene
VF2-17B165-94	15,6	12,0	9,1	5,6	4,7	9,4	4,5	
VF2-16A125-45	6,4	2,6	16,4	7,6	14,6	9,5	5,8	24-ene
VF2-15B103-3	10,0	17,3	14,1	4,2	4,9	10,1	5,7	27-dic
VF2-17B146-86	0,0	0,0	19,8	12,2	18,5	10,1	9,7	18-ene
VF2-16A148-55	1,0	23,4	2,0	1,0	24,9	10,5	12,5	18-ene
VF2-17B163-93	32,0	0,0	20,5	0,0	0,0	10,5	14,9	29-ene
VF2-17B169-96	10,4	14,4	16,2	14,0	4,0	11,8	4,8	02-ene
VF2-16A187-65	17,9	19,2	1,8	2,2	19,5	12,1	9,2	02-ene
VF2-17B162-92	5,6	21,3	10,1	16,8	7,4	12,2	6,6	24-ene
VF2-17B112-72	0,0	20,9	14,6	25,1	1,5	12,4	11,3	24-ene
VF2-15B110-7	4,8	11,7	22,2	26,1	1,9	13,4	10,6	24-ene
VF2-15B174-34	3,7	14,0	0,0	31,6	18,4	13,5	12,5	04-feb
VF2-17B180-102	15,6	20,3	16,8	7,9	7,9	13,7	5,6	09-ene
VF2-17B134-81	10,9	15,7	17,0	13,2	15,6	14,5	2,4	07-ene
VF2-15B122-13	17,3	16,2	10,8	20,0	18,2	16,5	3,5	15-ene

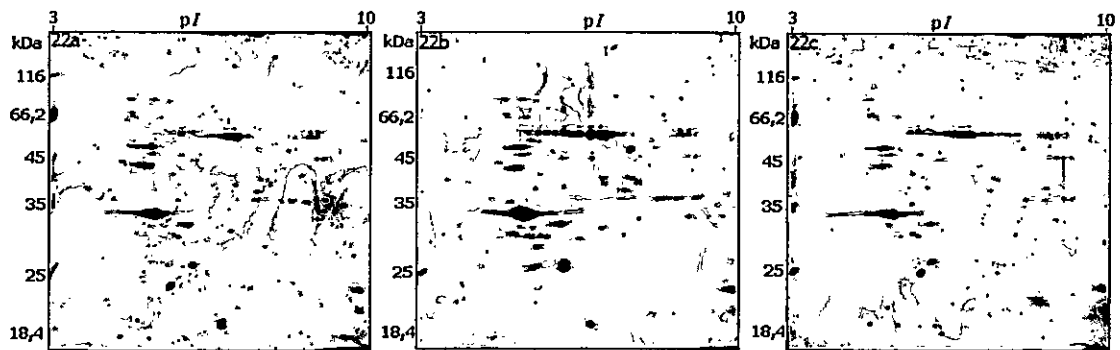
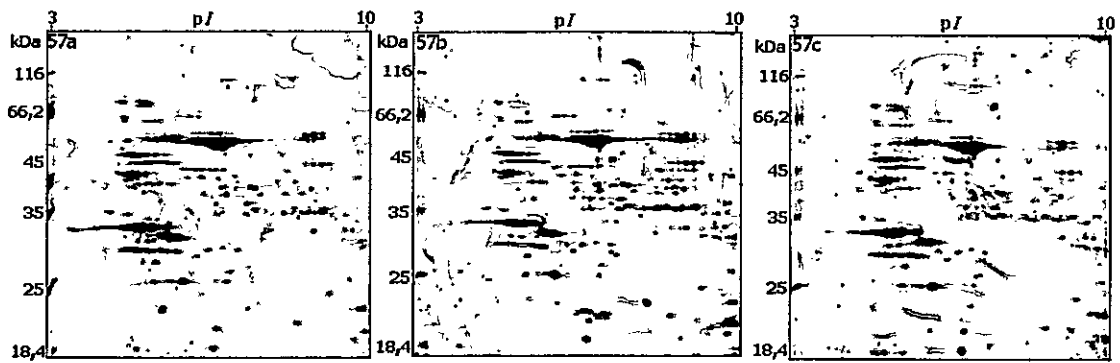
VF2-16A178-62	5,1	27,2	11,6	18,3	21,6	16,8	8,6	15-ene
VF2-17B176-100	6,4	23,9	28,2	18,5	9,2	17,2	9,3	24-ene
VF2-16A172-61	25,6	13,2	23,4	25,5	0,6	17,7	10,8	15-ene
VF2-16A134-49	21,1	18,2	21,8	17,9	10,2	17,8	4,6	15-ene
VF2-15B144-23	6,7	6,4	30,3	16,5	29,4	17,9	11,7	15-ene
VF2-17B170-97	14,6	29,2	12,5	16,2	24,2	19,3	7,1	07-ene
VF2-17B124-77	7,7	26,7	14,2	27,6	23,0	19,8	8,6	27-dic
VF2-15B141-21	25,1	23,5	15,7	19,6	15,7	19,9	4,4	27-dic
VF2-17B174-99	23,1	30,7	32,9	9,8	4,2	20,1	12,7	27-dic
VF2-17B130-80	14,5	21,0	19,5	30,6	15,6	20,2	6,4	15-ene
VF2-17B173-98	30,8	19,9	8,7	17,3	24,5	20,2	8,2	
VF2-17B168-95	13,4	15,3	21,6	27,7	26,8	21,0	6,5	24-ene
VF2-15B107-6	20,5	12,8	21,0	25,4	26,3	21,2	5,3	15-ene
VF2-16A138-51	25,5	28,0	26,9	18,8	10,3	21,9	7,4	27-dic
VF2-17B181-103	36,3	3,2	31,7	22,7	15,6	21,9	13,2	29-ene
VF2-15B111-8	22,2	36,5	16,1	0,0	35,5	22,1	15,1	18-ene
VF2-15B112-9	22,2	36,5	16,1	0,0	35,5	22,1	15,1	29-ene
VF2-17B111-71	23,3	16,0	28,0	18,2	28,8	22,9	5,7	27-dic
VF2-16A128-47	36,0	17,7	16,9	20,3	27,3	23,6	8,0	27-dic
VF2-17B109-70	10,6	20,1	32,2	31,7	29,1	24,7	9,3	28-dic
VF2-17B183-105	25,7	32,3	16,9	25,7	25,4	25,2	5,5	24-ene
VF2-16A132-48	20,3	24,0	32,5	17,2	32,6	25,3	7,0	27-dic
VF2-15B129-15	25,9	24,2	27,4	25,7	24,6	25,6	1,2	27-dic
VF2-17B117-73	28,0	34,0	22,6	19,9	23,7	25,6	5,5	07-ene
VF2-16A126-46	12,4	45,4	22,8	21,7	26,0	25,6	12,1	27-dic
VF2-17B120-74	21,0	24,2	30,4	36,7	23,0	27,0	6,5	15-ene
VF2-15B137-18	36,0	10,3	32,1	31,1	27,2	27,3	10,0	27-dic
VF2-16A194-69	27,7	31,9	35,3	23,6	18,3	27,4	6,7	02-ene
VF2-15B136-17	35,8	30,2	23,4	23,0	24,6	27,4	5,5	27-dic
VF2-15B179-37	35,5	23,5	25,7	28,2	26,3	27,8	4,6	02-ene
VF2-15B102-2	30,0	27,1	21,7	25,1	37,0	28,2	5,8	27-dic
VF2-17B178-101	20,6	30,4	26,1	40,1	28,8	29,2	7,1	02-ene
VF2-17B142-84	26,7	25,8	32,9	29,7	31,7	29,4	3,1	27-ene
VF2-15B155-27	32,0	18,2	36,0	42,1	19,7	29,6	10,4	27-dic
VF2-15B119-12	20,4	35,4	42,5	29,8	20,5	29,7	9,6	02-ene
VF2-17B122-76	28,0	26,9	37,1	29,2	29,4	30,1	4,0	15-ene
VF2-15B139-20	32,9	32,0	28,5	32,3	26,6	30,4	2,7	15-ene
VF2-17B154-87	22,0	44,4	40,3	19,8	26,1	30,5	11,2	02-ene
VF2-16A144-53	38,3	29,0	34,8	28,9	22,1	30,7	6,2	27-dic
VF2-15B169-33	30,0	31,5	23,2	30,0	40,5	31,0	6,2	02-ene
VF2-17B121-75	27,4	42,0	43,6	24,0	23,2	32,0	10,0	27-dic

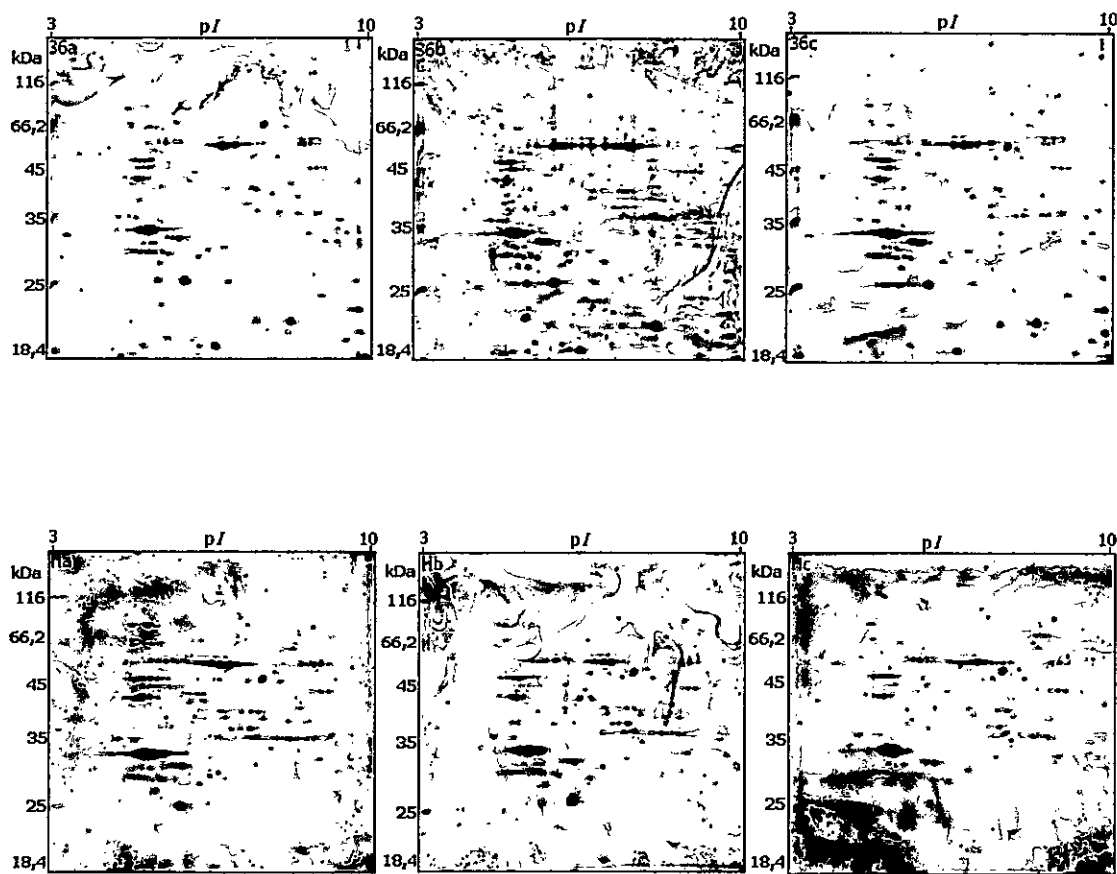
VF2-16A164-58	43,0	41,3	22,5	29,1	28,2	32,8	8,9	27-dic
VF2-16A188-66	32,3	48,6	36,6	39,0	9,4	33,2	14,6	15-ene
VF2-16A112-41	47,2	17,1	42,6	31,6	27,8	33,3	12,0	24-ene
VF2-15B177-36 (J36)	40,5	47,4	29,4	22,1	37,3	35,3	9,8	27-dic
VF2-16A159-57 (J57)	27,6	41,4	38,8	38,1	33,9	36,0	5,4	15-ene
VF2-15B143-22 (J22)	40,1	32,2	38,1	43,7	40,5	38,9	4,2	27-dic

( ) se muestra la denominación empleada en este seminario de título para las muestras

## ANEXO 2

A continuación se muestra cada uno de los 12 geles confeccionados para las 4 muestras analizadas.





**Figura anexo 2. Geles 2D de las muestras analizadas.** Se muestran los triplicados de cada una de las muestras analizadas (J57, J22, J36, H). A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular y en la parte superior se indica los valores de pH de la tira utilizada. Se cargaron 75  $\mu$ g de proteínas en cada uno de los geles.