



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Análisis del perfil de acumulación de proteínas  
durante la maduración de postcosecha, en  
cuatro variedades de duraznos  
(*Prunus Persica*)**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**CARLOS FELIPE SAFFIE VEGA**

**Director de Tesis: Ariel Orellana**

**Laboratorio de Genética Molecular Vegetal  
Departamento de Biología  
Santiago, Enero 2006**



UCH-FC  
Biotecnología  
S220  
C-1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS- UNIVERSIDAD DE CHILE



## **Análisis del perfil de acumulación de proteínas durante la maduración de postcosecha, en cuatro variedades de duraznos (*Prunus Persica*)**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**CARLOS FELIPE SAFFIE VEGA**

**Dr. Ariel Orellana López**  
Director de Memoria de Título



Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

**Dra Liliana Cardemil**  
Presidente Comisión

**Dr Michael Handford**  
Profesor corrector

Santiago de Chile, 27 de Enero, 2006



Nacido y criado bajo el alero de gran familia, mis primeros pasos los di en el colegio Academia de Humanidades donde me pico el bicho de la Biología, apoyado por mis padres decidí estudiar en ese momento la novedosa carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, período que culmina con este trabajo y tiempo en el cual pude conocer a mucha gente que se transformo en grandes compañeros y amigos. El camino no estuvo exento de dificultades, lo que me hace apreciar todo lo conseguido, y agradecer de manera infinita a mis padres por dejarme buscar siempre mi propio camino en busca de ser una mejor persona y profesional...ahora se vienen nuevos desafíos que pretendo afrontar con mucho entusiasmo y ánimo.

A todos los que lean esta tesis, humildemente me permito darles un consejo: pase lo que pase "Keep walking".

Graças de todo corazón a mi Familia !!!

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mis padres Antonio e Inés por su incansable apoyo y por soportarme todo este tiempo, también a mis hermanos Jorge y Cristian, a mi preciosa sobrina Josefa y a la Sandra que juntos a mis padres son mi núcleo familiar.

Un saludo especial a Carol, por todo su cariño, apoyo y amor durante todo el tiempo en que hemos estado juntos, además hacer extensiva mi gratitud para toda su familia.

A mi director de tesis, Dr Ariel Orellana por haberme guiado en el transcurso de este trabajo y darme la oportunidad de conocer el mundo laboral.

A todos los integrantes del Centro de Biotecnología Molecular, no los nombró a todos porque podría olvidar a alguien, para ellos un gran abrazo por hacer del tiempo en que se desarrollo este trabajo, una oportunidad única de compartir un gran grupo de trabajo y de amigos.

No quiero olvidar a nuestro antiguo laboratorio, Genética Molecular Vegetal, en especial a la Dra Liliana Cardemil, Dr Michael Handford, a Angélica Vega, Sebastián Urbina y Natalia Vergara por hacer de las horas de almuerzo, una grata oportunidad de compartir y hablar de la vida en general.

Para todos ellos y sin lugar a dudas a todos mis amigos por distraerme cuando era necesario les dedico este trabajo.



## ÍNDICE DE MATERIAS



TÍTULO	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE TABLAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
1.-INTRODUCCIÓN	1
2.-HIPÓTESIS	9
3.-OBJETIVOS	9
3.1.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
4.-MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1.-Duraznos y Nectarines	10
4.1.1-Reactivos	12
4.2.-Extracción de proteínas	12
4.2.1 Cuantificación de proteínas	13
4.2.2 Primera dimensión : Isoelectroenfoque	14
4.2.3 Equilibración de strips y segunda dimensión: SDS – PAGE	14
4.2.4 Tinción de los geles Bidimensionales.	15
4.2.5 Captura de imagen	15
4.3 Análisis de los geles.	16
4.3.1 Normalización de la Imagen	16
4.3.2 Identificación de cambios cualitativos y cuantitativos	16
4.3.3 Tinción y secuenciación de spots	17
4.3.4 Identificación de las proteínas.	18



<b>5.0 RESULTADOS</b>	
<b>5.1.1 Separación de proteínas de duraznos y nectarines usando distintos protocolos de extracción.</b>	<b>19</b>
<b>5.1.2 Extracción de proteínas desde distintas variedades de duraznos y nectarines.</b>	<b>22</b>
<b>5.2 Separación de proteínas de durazno O'Henry en la condición de cosecha (A) y maduro (B).</b>	<b>26</b>
<b>5.3 Separación de proteínas de durazno Elegant Lady en la condición de cosecha (A) y maduro (B).</b>	<b>33</b>
<b>5.4 Separación de proteínas del nectarín July Red en la condición de cosecha (A) y maduro (B).</b>	<b>39</b>
<b>5.5 Separación de proteínas de Angelus en la condición de cosecha (A) y maduro (B).</b>	<b>46</b>
<b>5.6 Análisis del proteoma de las variedades O'Henry, Elegant Lady, July Red y Angelus en la condición de cosecha. Diferencias varietales no provocadas por la maduración</b>	<b>53</b>
<b>5.7 Secuenciación de proteínas.</b>	<b>60</b>
<b>6.-DISCUSIÓN</b>	<b>65</b>
<b>7.-CONCLUSIONES Y PROYECCIONES</b>	<b>78</b>
<b>8.-REFERENCIAS</b>	<b>80</b>
<b>9.-ANEXOS I.</b>	<b>85</b>

## INDICE DE FIGURAS



<b>Figura 1.-</b> Cambios fisiológicos que se producen en las distintas variedades producto del ablandamiento en el paso de cosecha a maduro	5
<b>Figura 2.-</b> Separación de proteínas de duraznos y nectarines usando distintos protocolos de extracción	20
<b>Figura 3.-</b> Separación de proteínas obtenidas desde distintas variedades durante la maduración de frutos.	23
<b>Figura 4.-</b> (A) Proteínas de durazno O'Henry en condición Cosecha (B) Proteínas de durazno O'Henry en condición maduro.	26,27
<b>Figura 5.-</b> Proteínas que cambian su grado de acumulación en las dos condiciones de postcosecha. O.P.1, O.P.2, O.P.3 y O.P.4.	32
<b>Figura 6.-</b> (A) Proteínas de durazno Elegant Lady en condición cosecha (B) Proteínas de durazno Elegant Lady en condición maduro	33,34
<b>Figura 7.-</b> Análisis spots que cambian su grado de acumulación en las dos condiciones de postcosecha. E.P.1, E.P.2, E.P.3.	38
<b>Figura 8.-</b> (A) Proteínas del nectarin July Red en condición Cosecha (B) Proteínas del nectarin July Red en condición maduro	39,40
<b>Figura 9.-</b> Análisis spots que cambian su grado de acumulación en las dos condiciones de postcosecha. J.P.1, J.P.2, J.P.3 y J.P.4.	44
<b>Figura 10.-</b> (A) Proteínas de durazno Angelus en condición Cosecha (B) Proteínas de durazno Angelus en condición maduro	44,47
<b>Figura 11.-</b> Análisis de proteínas que cambian su grado de acumulación en las dos condiciones de postcosecha. N.P.1, N.P.2, N.P.3, N.P.4, y N.P.5.	52
<b>Figura 12.-</b> Cuantificación proteínas 21 y 24 en la condición de cosecha	56



<b>Figura 11.</b> Cuantificación proteínas V.P.1, V.P.2 y V.P.3.	59
<b>Figura 12.-</b> Identificación de spots secuenciados.	61
<b>Figura 13.-</b> Esquema propuesto para vías activadas durante el stress inducido por exceso H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .-	72

### INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resumen calidad de frutos individuales usados para la extracción de proteínas por variedades y estadio.	11
<b>Tabla 2.-</b> Determinación del coeficiente de variación de 30 Spots en los seis geles bidimensionales de la variedad O'Henry.	29
<b>Tabla 3.-</b> Determinación del coeficiente de variación de 30 spots Mayoritario en los seis geles bidimensionales de la variedad Elegant Lady.	36
<b>Tabla 4.-</b> Determinación del coeficiente de variación de 30 spots Mayoritario en los seis geles bidimensionales de la variedad July Red.	42
<b>Tabla 5.-</b> Determinación del coeficiente de variación de 30 spots mayoritario en los seis geles bidimensionales de la variedad Angelus.	49
<b>Tabla 6.-</b> Búsqueda de diferencias varietales en la condición de cosecha.	55
<b>Tabla 7.-</b> Identificación de las proteínas secuenciadas.	62



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BLAST:</b>	“Basic local alignment search tool” (herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales)
<b>° Brix:</b>	Grados Brix (medición del contenido de azúcares de una muestra)
<b>°C :</b>	Grados Celsius
<b>CHAPS:</b>	3 - [(3 - Cholanilpropil) dimetilamonio] - 1- propanosulfonato).
<b>CV:</b>	Coefficiente de variación
<b>DTT:</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA:</b>	Ácido Etileno Diamino Tetracético (ethyldiaminetetraacetic acid)
<b>EST:</b>	Marcador de secuencias expresadas (expressed sequence tag)
<b>g:</b>	Gramos
<b>KDa:</b>	Kilo Daltons
<b>P.I :</b>	Punto isoelectrico
<b>P.M :</b>	Peso Molecular
<b>PMSF :</b>	Phenylmethylsulfonyl fluoride (Fenilmetilsulfonil fluorido)
<b>SB3 :</b>	3 - (Decildimetilamonio) propano sulfonato
<b>SDS:</b>	Dodecil Sulfato Sodio
<b>SPOT:</b>	Señal correspondiente a “una” proteína en un gel bidimensional
<b>STRIP :</b>	Gel de gradiente de pH para la primera dimensión (isoelectroenfoque)
<b>TCEP:</b>	Tris (2-carboxietil) fosfine hidrociorato
<b>VH :</b>	Voltios hora
<b>% VOL ADJ:</b>	Porcentaje de volumen ajustado

## RESUMEN

Chile es uno de los principales proveedores de frutas de carozos a nivel mundial. Es por esto que estudiar los procesos fisiológicos a los que se ve sometido el fruto es de alta importancia para entender el comportamiento de ellos una vez que son cosechados. Un evento de alta importancia es la maduración, proceso en el cual los duraznos y nectarines sufren una serie de modificaciones que los dejan aptos para el mercado consumidor. Dicho proceso se inicia una vez que el fruto es cortado del árbol, momento en el cual posee una alta firmeza, y continua hasta que el fruto se ablanda alcanzando una firmeza que permite su consumo. Durante el período de tiempo que transcurre durante este ablandamiento, se observan una serie de cambios en textura, color y cualidades organolépticas. Existen numerosos estudios que dan cuenta de algunos cambios particulares que ocurren durante la maduración, pero existe poca información sobre los cambios globales que sufre el fruto. En este trabajo de tesis, se realizó un análisis del perfil de acumulación de proteínas, en dos condiciones de postcosecha, para cuatro variedades de *Prunus persica*, que presentan diferencias fisiológicas observadas en parámetros tales como la producción de etileno, la tasa de respiración y la cantidad de sólidos solubles. Estas variedades además muestran distinta velocidad en alcanzar la maduración.

Para realizar este estudio se implementó la técnica de separación de proteínas en geles bidimensionales, lo que permitió realizar las comparaciones entre la condición de cosecha (fruto con firmeza superior a 5kg) y maduro (fruto con firmeza menor a 1kg, listo para ser consumido) para las cuatro variedades. Estos estudios permitieron identificar proteínas que no cambian su nivel de acumulación, y otras que si lo hacen durante la maduración. Fue interesante observar que algunos cambios de ciertas proteínas son

específicos para una variedad, mientras que otros cambios se aprecian en más de una de las variedades analizadas.

Algunas de las proteínas identificadas en este análisis fueron secuenciadas, lo cuál nos permitió conocer a que correspondían y de esta forma sacar algunas deducciones sobre el comportamiento de los frutos durante estas condiciones de postcosecha en cada una de las variedades utilizadas en este estudio. También se secuenciaron proteínas que no cambian en ninguna condición, que nos permiten aprender acerca del metabolismo basal de los frutos. Los resultados muestran que una de las proteínas que aumenta de manera significativa durante la maduración de los frutos corresponde a la enzima poligalacturonasa. Este cambio esta en directa relación con la disminución en la firmeza de los frutos. Otras proteínas que también cambian están relacionadas a elementos inducidos por stress o enzimas del metabolismo de azúcares. Este estudio es la primera etapa de un análisis que nos lleve a conocer los cambios que ocurren en la maduración de los frutos desde el punto de vista de la proteómica.

## ABSTRACT

Chile is one of the main suppliers of stone fruits world-wide. This is why the study of the physiological processes that occurs in the fruit are important to understand their behavior once they are harvested. An important process is the ripening, a process by which peaches and nectarines undergo a series of modifications to reach the proper conditions for consumption. This process starts once the fruit is taken from the tree, when the fruit is firm, and goes on until the fruit softens, reaching a low firmness allowing its consumption. During the softening, a series of changes in texture, color and organoleptics qualities are observed. There is a number of studies indicating that some changes take place during ripening, but little information exists on the global changes that undergoes the fruit. In this thesis work, an analysis of the protein accumulation profile was performed, in two postharvest condition, using four varieties of *Prunus persica*, that exhibited physiological differences in parameters such as the ethylene production, respiration rate and the amount of soluble solids. In addition, these varieties show different ripening rates.

In order to carry out this study, the separation of proteins using bidimensional gels was implemented. This technique allowed us to compare the protein profile between fruits taken from harvest condition (fruit with firmness higher than 5kg) and mature (fruit with a firmness lower than 1kg and ready to be consumed) for the four varieties. These studies allowed us to identify proteins that do not change their level of accumulation, as well as other that change during ripening. It resulted interesting to find that some changes in the presence of certain proteins are specific for a variety, whereas other changes are observed in more than one variety.

Some proteins identified in this analysis were sequenced, which allowed us to identify them and thus make some deductions on the behavior of the fruits during

postharvest for each of the varieties used in this study. In addition, we also sequenced proteins that do not change under any condition, to learn about the basal metabolism of the fruits. The results show that one of the proteins that significantly increase during the maturation of the fruits corresponds to the enzyme polygalacturonase. This change is in direct relationship with the reduction in the firmness of the fruits. Other proteins that also change are related to elements induced by stress or enzymes of the sugar metabolism. This study is the first stage of an analysis that allows us to understand the changes that take place during fruit ripening from a proteomic point of view.

## 1. INTRODUCCIÓN

Chile es uno de los principales exportadores de carozos desde el hemisferio sur hacia el hemisferio norte. Los principales destinos de estas exportaciones son el mercado europeo y norteamericano. Dentro de los carozos se encuentran los duraznos y nectarines (*Prunus persica*) cuyas exportaciones alcanzaron el año 2003, 5,7 millones de cajas de duraznos y 6,8 millones de cajas de nectarines ([www.agroindustrias.org](http://www.agroindustrias.org)). Chile se ve favorecido por inmejorables condiciones para el cultivo de este frutal, tanto meteorológicas como agroindustriales, así como carencia de lluvias durante la etapa de desarrollo del fruto, y la disponibilidad de suelo necesario para la cosecha. Otra de las grandes ventajas de la industria chilena es la contra estación, aspecto que permite poner fruta en los mercados antes citados en un momento en el que no existe producción local, por lo tanto no existe ese tipo de competencia.

Las características organolépticas que tienen los duraznos y nectarines, por las cuales son apreciadas por el mercado, se alcanzan durante la vida de postcosecha del fruto. En el instante en que son cosechados los duraznos y nectarines presentan una alta firmeza (5 kg de presión), lo que impide su consumo inmediato, por esto requieren de un tiempo a temperatura ambiente con el fin de alcanzar la firmeza de consumo (1kg de presión). Durante este tiempo de espera, el fruto presenta una serie de cambios fisiológicos, como son el aumento del contenido de azúcares, aumento de aromas, cambio de pigmentación, por nombrar algunos cambios que en esta tesis son denominados como maduración, (Hay que destacar que también existe una maduración propia del durazno durante su desarrollo en el árbol, sin embargo, en esta tesis la maduración se refiere al término "ripening", que hace referencia a la maduración del fruto una vez que es cortado del árbol). Desde la

década del setenta el proceso de maduración de frutos ha despertado gran interés por su importancia comercial, alimenticia; y desde el punto de vista científico, por la gran cantidad de preguntas en biología vegetal debido al alto número de modificaciones que sufren durante este proceso.

La maduración de duraznos y nectarines es climatérica al igual que otros frutos como el tomate, el melón y la banana. Este tipo de maduración se caracteriza porque durante este proceso aumenta la tasa de respiración y la biosíntesis de etileno. Los resultados de distintas investigaciones desarrolladas en estos frutos muestran que el etileno es necesario para la coordinación y desarrollo de la maduración. Esto se ha ilustrado por la disminución de velocidad o inhibición total del proceso en plantas transgénicas en que se afecta de algún modo la producción de etileno (Oeller y col, 1991; Theologis y col, 1993; Picton y col, 1993; Ayub y col, 1996). En el transcurso de la maduración se ha visto que cambian la expresión de muchos genes, entre los que se cuentan algunos propios de la producción de etileno, otros relacionados a la acumulación de carotenoides, degradación de clorofila, síntesis de compuestos volátiles así como también algunos involucrados en el metabolismo de la pared celular que conllevan a un ablandamiento del fruto. (Coupe y col 1997; Giovanonni, 2001)

Los cambios mencionados son comunes a la mayoría de los frutos climatéricos, sin embargo, la respuesta de cada especie a la maduración de postcosecha es distinta y más aun, dentro de cada variedad en una misma especie, la influencia del etileno y la expresión de los mencionados genes y acumulación de algunas proteínas no es la misma (Traitotti y col 2003, Brummell y col 2004, Brenna y col 2004). Dentro de *Prunus persica* existen una amplia gama de variedades que presentan una serie de diferencias genéticas, fenotípicas,

que son altamente interesantes para su estudio comercial puesto que varían en textura y calidad para la exportación, (Von Mollendorf, 1987; Crisosto y col, 1999).

Además, las variedades de duraznos muestran cambios en parámetros fisiológicos medidos durante su proceso de maduración, como es el caso de la producción de etileno, la tasa de respiración, la cantidad de sólidos solubles, por nombrar algunas ([www.asoex.com](http://www.asoex.com) , [www.genomavegetal.cl](http://www.genomavegetal.cl)). Como ejemplo, en el caso del ablandamiento durante la maduración, se ha descrito que posee características particulares en cada variedad (aunque en todas ellas dominadas por un cambio notable en la pared celular), en donde existen diferencias en las actividades de enzimas que participan el proceso de degradación de la misma, por ejemplo la poligalacturonasa, la expansina o la pectinmetilesterasa que han sido estudiadas en laboratorios fuera de Chile como en el nuestro (Brummell y col 2004; González, Tesis de pregrado 2005) y que dan cuenta de cambios en la expresión de dichos genes y de actividad de sus respectivas proteínas.

En esta tesis, se trabajó con cuatro variedades de *Prunus persica*, la primera de ellas es *O'Henry* que a primera vista se caracteriza por tener un tamaño grande y tener su superficie cubierta entre un 70 a un 95 % por pigmentación roja, seleccionada por ser tradicionalmente una variedad estudiada (Brummell y col 2004) y que durante la temporada 2003 demostró ser de mala calidad para la exportación. Esta es una variedad de durazno que ha sido producido por muchos años, y en Chile ha sido intensamente cultivada. La segunda variedad seleccionada correspondió a *Elegant lady*, un fruto de tamaño medio – largo y que tiene su superficie cubierta entre un 70 a un 95% de pigmentación roja. Este es un durazno que ha mostrado tener una buena vida de postcosecha, por lo tanto ha resultado una buena variedad para ser exportada. La tercera variedad en estudio fue

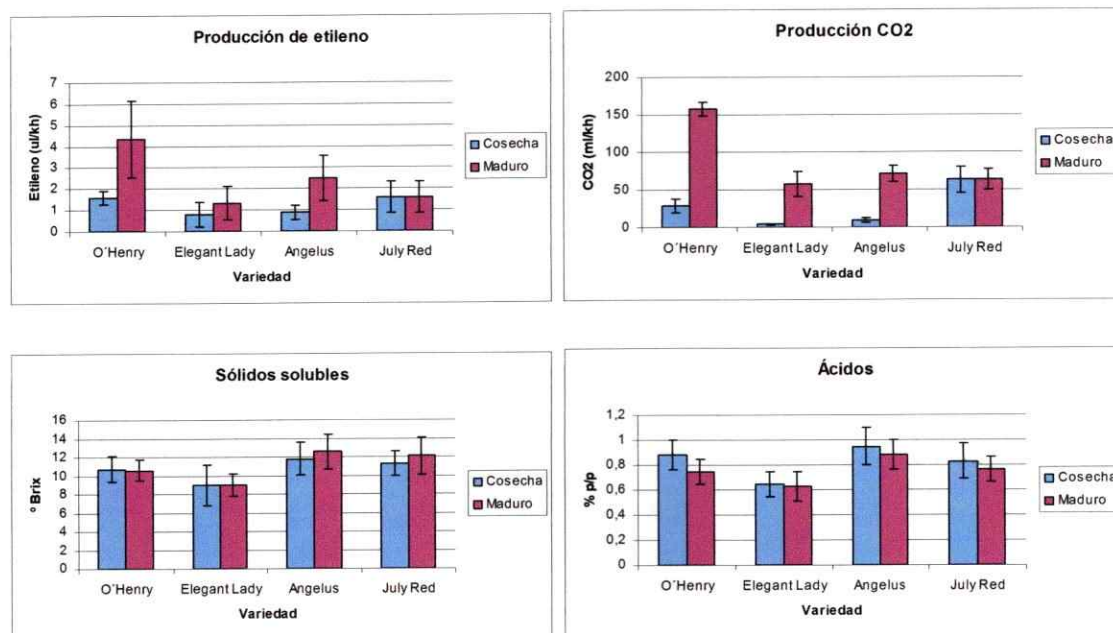


*Angelus*, un durazno que históricamente no ha tenido una buena vida de postcosecha por lo tanto su producción ha disminuido notoriamente. Finalmente, se seleccionó un nectarín, *July Red* que se caracteriza por un tamaño grande y que posee entre un 40 a un 80 % de su superficie cubierta de pigmentación roja. ([www.satotrading.com](http://www.satotrading.com), [www.asoex.cl](http://www.asoex.cl), [www.genomavegetal.cl](http://www.genomavegetal.cl)).

Cada una de estas variedades de duraznos y nectarines fueron sometido a dos condiciones, una de ellas se refiere a la condición de “cosecha”, en donde los frutos fueron sacados del árbol y seleccionados según su tamaño, forma y principalmente firmeza, la cual alcanza un valor superior a los 5kg. La otra condición denominada “maduro”, se refiere a frutos que fueron mantenidos a temperatura ambiente hasta que se produjo el ablandamiento del fruto hasta alcanzar una firmeza inferior a 1kg, estando en condición de ser consumidos. Tomando como referencia estas dos condiciones se procedió a tomar muestras de frutos de cuatro variedades de *Prunus persica*,

El análisis de los frutos provenientes de las cuatro variedades desde las condiciones de cosecha y maduro muestra que a nivel fisiológico, existen una serie de cambios que son interesantes (Figura 1, Anexo II). Por ejemplo, las cuatro variedades muestran cambios en el contenido de etileno y CO<sub>2</sub> al comparar duraznos provenientes de cosecha y maduros. Estos cambios son distintivos en cada una de las variedades. Por otro lado, no se aprecia un gran cambio en el contenido de azúcares y en acidez durante la madurez. También es interesante observar que entre las cuatro variedades existen diferencias en el tiempo en que cada una de ellas necesita para alcanzar la presión adecuada para el consumo, O’Henry y *Angelus* demoran 6 días, *Elegant Lady* 7 días y *July Red* 3 días. Los datos mostrados corresponden a mediciones en 30 frutos de cada variedad y en ambas condiciones de

realizadas por la unidad de Postcosecha del INIA en el marco del proyecto genómica funcional en nectarines. (<http://www.genomavegetal.cl>).



**Figura 1.-** Cambios fisiológicos que se producen en las distintas variedades producto del ablandamiento en el paso de cosecha a maduro

Sobre la base de las diferencias fisiológicas mostradas en la Figura 1, es esperable observar cambios en la acumulación de proteínas, al comparar frutos provenientes de la cosecha versus maduros y entre las distintas variedades en estudio.

Algunas de las proteínas que se espera que estén más acumuladas en la condición madura de todas las variedades son aquellas que tienen relación con el desmantelamiento de pared celular que acompaña al proceso de maduración. Además, es posible que también existan cambios en una serie de proteínas que son codificadas por genes que se inducen durante el proceso de maduración de frutos climatéricos entre ellos se cuentan proteínas que alteren la composición de carbohidratos, proteínas involucradas en la degradación de clorofila, otras

involucradas en la conversión de almidón en azúcar por nombrar algunas (Medina Suarez y col, 1997; Giovanonni y col 2001; Brummell y col 2004).

Como se observa en la Figura 1, además de las diferencias en el proceso de ablandamiento entre variedades, también se presentan otros cambios en los restantes parámetros fisiológicos, lo que hace suponer que las diferencias desencadenadas durante el proceso de maduración involucran múltiples cambios a nivel de genes y proteínas. Como se menciono anteriormente, existen estudios que explican algunos de los cambios que sufre el fruto, como por ejemplo el aumento de la cantidad de etileno y el ablandamiento, pero el proceso involucra cambios más complejos que afectan otras propiedades de los duraznos y nectarines, es por esto un análisis global ya sea de la expresión de genes o de la acumulación de proteínas podría ayudar a entender los mencionadas cambios. (Anjanasree et al 2005, Trainotti y col 2003).

Para analizar estos cambios hay varias aproximaciones experimentales como construir genotecas de cada una de las condiciones y variedades, secuenciar los EST's y seguir un perfil de expresión digital. Otra alternativa es realizar estudios de correlación génica utilizando micro o macroarrays. Alternativamente, se puede utilizar una aproximación que ha sido menos explorada y que consiste en comparar los cambios cualitativos y cuantitativos que ocurren en la acumulación de proteínas durante la maduración. Esta aproximación proteómica se puede además extender a la comparación de las distintas variedades de duraznos.

Esta tesis se enfoco en esta última estrategia, como una de manera de descubrir múltiples factores involucrados en el proceso de maduración de variedades y ver cambios más globales que se producen durante este proceso. Para hacerlo se decidió comparar el

proteoma de los frutos, que es el conjunto de proteínas que se acumulan en una condición determinada, y una de las maneras más utilizadas para resolver el gran número de proteínas que lo constituyen, es el uso de geles bidimensionales, metodología que permite apreciar un gran número de proteínas en un solo gel. La ventaja de estudiar el proteoma es que podemos identificar muchos cambios de una sola vez siguiendo el perfil de acumulación en las condiciones a comparar. Además, esta técnica puede ser complementada con la secuenciación de proteínas, identificando proteínas que cambian o permanecen inalteradas al comparar variedades o etapas de la maduración. De esta forma podemos aprender mucho del proceso de maduración de cada una de las variedades y además buscar patrones de comportamiento común y también particular de cada una de ellas.

El estudio de las proteínas es ventajoso porque en muchos casos los niveles de expresión de RNAm no se corresponde con los niveles de acumulación de la proteína, producto de modificaciones tanto post transcripcionales como post transduccionales, por lo que un análisis a partir de RNAm o EST's no necesariamente se corresponde con la parte funcional a nivel celular como es la proteína. (Anderson y col 1997; Anderson y col, 1998; Gygi y col., 1999).

El primer problema que se presenta para analizar el proteoma es obtener las proteínas debido a que cada sistema biológico presenta distintas dificultades para la extracción de proteínas. En el caso de los duraznos y nectarines se presentan dos problemas principales que en otros sistemas como bacterias y células animales no se presentan. Uno de ellos se refiere a la cantidad de proteína; por ejemplo, a partir 1g de músculo de ratón se puede obtener aproximadamente 400mg de proteína (Casar y col, 2004), en cambio al trabajar con duraznos se obtienen aproximadamente 200µg de proteínas a partir de 1 g de tejido. Por

esta razón el protocolo de extracción de proteínas debe ser lo más eficiente posible en términos de rendimiento. El segundo problema que se presenta al extraer y analizar proteínas desde los frutos son la gran cantidad de polifenoles, terpenos y polisacáridos presentes en ellos, todos estos compuestos afectan el análisis de las proteínas en geles bidimensionales.

El uso de esta metodología para analizar los cambios cualitativos y cuantitativos que ocurren durante el proceso de maduración de cada variedad debería permitir observar un gran número de proteínas que pueden estar cambiando o permaneciendo inalteradas en este proceso fisiológico. Así sería posible identificar proteínas involucradas que sean comunes o bien particulares de alguna variedad, marcando así una diferencia en el proceso de maduración a nivel molecular y poder atribuirle algún significado con relación a las diferencias organolépticas.

Esta técnica ha sido utilizada satisfactoriamente para seguir el patrón de maduración de otros frutos, como la banana (Domínguez – Puigjaner y col, 1992) y también para comparar sistemas tan semejantes como ecotipos de *Arabidopsis thaliana* encontrando cambios cualitativos y cuantitativos (Rossignol y col, 2004; Bahrman y col, 2004; Radzikowski y col, 2002).

Por los antecedentes planteados hasta ahora, en esta Tesis se plantea la siguiente Hipótesis :

## **2. HIPOTESIS**

El proceso de maduración de diferentes variedades de duraznos desencadena cambios específicos en cada una de ellas a nivel de proteínas, así como probablemente comportamientos comunes a todas, que pueden explicar algunas diferencias y también similitudes fisiológicas y organolépticas.

## **3. OBJETIVO**

Analizar el perfil de acumulación de las diversas proteínas durante la maduración de cuatro variedades de duraznos utilizando geles bidimensionales.

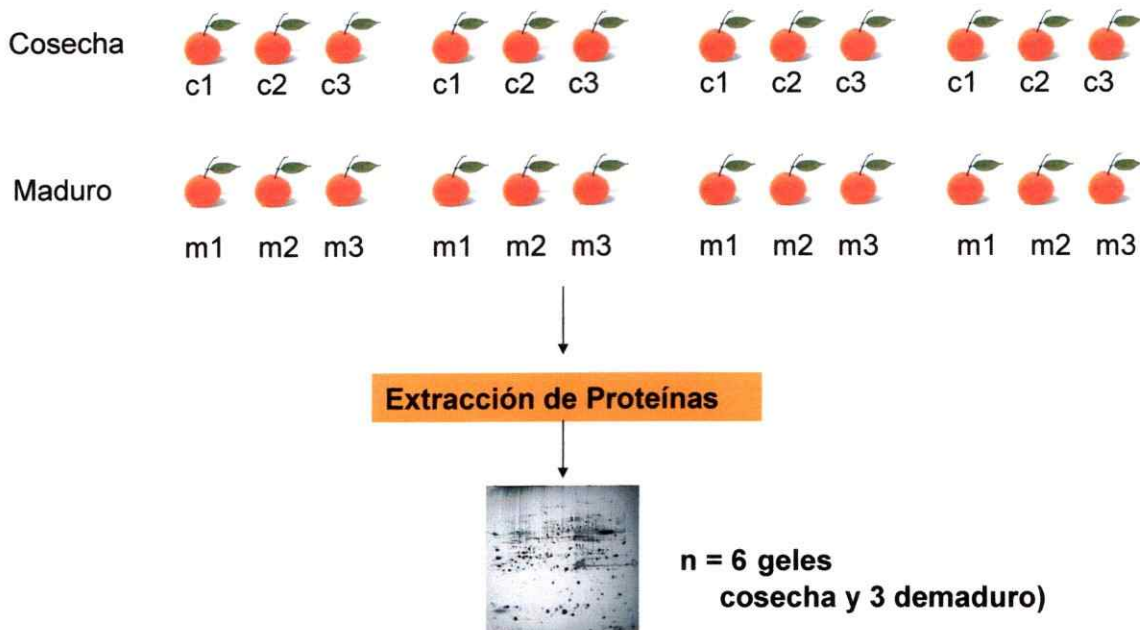
### **3.1 Objetivos específicos**

- 1.- Obtener un protocolo de extracción eficiente de proteínas de duraznos y resuspenderlas en un buffer compatible con la técnica de geles 2D.
- 2.- Estandarizar las condiciones de isoelectroenfoque para la primera dimensión
- 3.- Seleccionar proteínas que no cambien su perfil de acumulación y utilizarlas en la normalización y análisis de imagen.
- 4.- Teñir con plata y secuenciar proteínas de interés utilizando LC/MS MS.
- 5.- Analizar la secuencia de los spots y entender el comportamiento de las proteínas en el contexto de la maduración de duraznos

## 4.0 MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1 Duraznos y nectarines

Duraznos y nectarines fueron suministrados por la unidad de postcosecha del INIA-La Platina. Estos frutos fueron recolectados en huertos de empresas productoras y exportadoras ubicadas en la región metropolitana. Para la extracción de proteínas se utilizaron duraznos y nectarines de cuatro variedades provenientes de dos condiciones de postcosecha distintas, frutos tomados a la cosecha y frutos con madurez de consumo. Por cada variedad y en cada estadio se utilizaron 3 frutos distintos, de cada uno de los frutos se realizó un gel bidimensional, completando entonces 24 geles (4 variedades x 2 condiciones x 3 geles = 24 geles).



Estos frutos se comportaban según el promedio de la cosecha del año 2003 cuyas características se muestran en la Figura 1. Para todos los frutos se utilizó las regiones ecuatoriales del mismo. En la **Tabla 1** se resumen las características individuales de los frutos utilizados.

**Tabla 1. Resumen calidad de frutos individuales usados para la extracción de proteínas por variedades y estadio.-** Por cada variedad en el estadio de cosecha se eligió el fruto por su firmeza y en maduro se escogió por la firmeza del fruto y también el porcentaje de jugo libre.

	Cosecha Firmeza (kg) *	Maduro Firmeza (kg) / % Jugo libre
<b>O'HENRY</b>	Fruto a : 7.5 Fruto b : 7.0 Fruto c : 8.0	Fruto A : 0.75 / 35.62% Fruto B : 0.81 / 31.05% Fruto C : 0.75 / 37.43%
<b>ELEGANT LADY</b>	Fruto a : 5.5 Fruto b : 6.5 Fruto c : 6.9	Fruto A : 0.55 / 33.25% Fruto B : 0.75 / 35.70% Fruto C : 0.67 / 36.43%
<b>ANGELUS</b>	Fruto a : 8.3 Fruto b : 7.2 Fruto c : 7.5	Fruto A : 0.95 / 32.40% Fruto B : 0.65 / 36.70% Fruto C : 0.80 / 38.40%
<b>JULY RED</b>	Fruto a : 5.8 Fruto b : 5.3 Fruto c : 4.8	Fruto A : 0.6 / 35.41% Fruto B : 0.7 / 29.85% Fruto C : 0.5 / 38.41%

\* En frutos obtenidos del estadio cosecha no se mide % Jugo libre debido a la alta firmeza de los frutos.

Según los datos entregados en la introducción, para 30 frutos de **O'Henry** del estadio cosecha la firmeza promedio fue de 7,4kg y en el estadio maduro fue de 0.81kg , en el caso de **Elegant Lady** el promedio de firmeza en cosecha fue de 6.45kg y en frutos maduros de 0.64kg. Para la variedad **Angelus** fue de 7.5kg v/s 0.9kg y en **July Red** 5.3kg v/s 0.65kg para los frutos de cosecha y maduros respectivamente.



Los valores de firmeza y porcentaje de jugo libre de los frutos utilizados para la extracción de proteínas (**Tabla 1**) se comportan de acuerdo al promedio de las mediciones realizadas para 30 frutos por la unidad de postcosecha de INIA La Platina.

#### **4.1.1 Reactivos**

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron todos de grado analítico y comercializado por distintas empresas. De Sygma se utilizó SB3, Anfolitos de pH 3 –10 y 5 – 7, de la empresa Merck se utilizó Ácido acético, EDTA, Etanol, HCl 37%, PMSF, Urea, Tiourea, Ditionito, Nitrato de plata, Formaldehído y Carbonato de sodio, en tanto de la empresa US Biological se obtuvo Sacarosa, Tris ultrapuro y CHAPS, por otro lado de Applichem se ocupó Iodoacetamida y Temed, de Winkler se obtuvo el DTT , de Fermentas se uso el estándar de Peso Molecular y finalmente de Biolabs se usó el BSA (10µg/ul).

#### **4.2 Extracción de proteínas**

La muestra biológica de cada una de las variedades y en cada uno de los dos estadios fue sometido al mismo protocolo de extracción de proteínas. Este consistió en tomar 2g del mesocarpo del fruto, el que posteriormente se molió en N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino. Luego se transfirió a un tubo corex de 30 ml y se agregó 5 ml de fenol saturado básico y 5 ml de tampón de extracción (Sacarosa 0.7M, Tris HCl 0.05M pH 7.8, PMSF 0.002M, DTT 0.002M, EDTA 0.005M, HCl 0.03M y KCl 0.1 M), la mezcla se agitó en vortex a máxima fuerza por 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 12.000g por 14 minutos a 4°C obteniéndose dos fases. La fase inferior era la acuosa, con una gruesa y blanquecina interfase y una fase superior de fenol, en la cual se encontraron las proteínas.

Se retiró la fase fenólica superior y se transfirió a un nuevo tubo corex de 30 ml al cual se le agregaron 3 ml de fenol saturado básico y 3 ml del tampón de extracción ya mencionado. Se centrifugó a 12.000g por 14 min, este último paso se repitió una vez más. La fase fenólica se transfirió a 3 tubos corex de 30ml y se le agregó 5 volúmenes de una solución de acetato de amonio 0.1M en metanol, la cual se utiliza a  $-20^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se mantuvo la mezcla a esa temperatura durante toda la noche. Se centrifugó a 12.000g por 6 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se agregó 3ml de la solución de acetato de amonio 0.1M en metanol y se agitó en vortex a máxima fuerza por 5 minutos. El tubo se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, y se repitió la centrifugación y se eliminó el sobrenadante. Luego, se agregó 3 ml acetona 80% la cual se encontraba a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se agitó en vortex a máxima fuerza por 5 minutos y se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12.000g por 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secando a  $37^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Las proteínas fueron resuspendidas en el tampón de isoelectroenfoque R2D2 (Urea 5M, Tiourea 2M, CHAPS 2% p/v, SB3 - 10 2% p/v, DTT 20mM, TCEP 5mM, anfolitos de rango de pH 3- 10 0.25% y 5 - 7 0.5%) en un volumen final que varió entre los 100 y 200  $\mu\text{l}$ , una vez resuspendidas se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **4.2.1 Cuantificación de proteínas**

Para la cuantificación de las proteínas se usó el procedimiento de Bradford (Bradford 1976) modificado para placas ELISA de 96 pocillos. La curva de calibración fue realizada con 0, 1, 1.5, 2, 3  $\mu\text{g}$  de BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Asimismo, se utilizaron diluciones (por triplicado) de las proteínas extraídas desde los frutos.

Posteriormente se midió la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro Sunrise marca Tecan -con el programa Magellan.

#### **4.2.2 Primera dimensión: Isoelectroenfoque**

Para la primera dimensión se tomó 120 µg de proteínas, se agregó 6,6 µl DTT 1M, 15,5 µl de TCEP 0.1M y se adicionó buffer R2D2 hasta completar 310 µl de solución total, (concentración final DTT: 20Mm y concentración final TCEP: 2mM) posteriormente se incubó por 30 min. a 30 °C y luego se agregó a la bandeja de isoelectroenfoque de BIO-RAD, a continuación se puso sobre la muestra el strip de pH 3 – 10 NL de 17 cm , se dejó por 30 min y luego se agregó sobre el strip aceite mineral con el objetivo de evitar la deshidratación del gel durante el isoelectroenfoque .

El programa usado para la primera dimensión se describe a continuación:

- 1.- Rehidratación activa a 50 V por 11 hrs.
- 2.- Ascenso lineal del voltaje hasta 150V por 30min
- 3.- Ascenso lineal del voltaje hasta 2000V por 1H y 45 min
- 4.- Ascenso rápido del voltaje hasta 6000V por 3Hrs y 30 min
- 5.- Ascenso rápido del voltaje hasta 10000V por 7Hrs

Alcanzando un voltaje - hora aproximado de 69500VH con un tiempo total de isoelectroenfoque de 23Horas y 45 minutos.

#### **4.2.3 Equilibración de strips y segunda dimensión: SDS - PAGE**

Una vez terminada la primera dimensión, los strips fueron sacados de la bandeja de isoelectroenfoque y colocados en 3ml de la solución de equilibrio 1 (3,6 g de urea, 2% de

SDS 10 %, 2,5 % buffer 1,5M pH 8,8, 2% glicerol ) y a la que se le agregó DTT hasta una concentración de 2%, los strip permanecieron por 15 minutos en esta solución. Luego se traspasó a 3ml de la solución de equilibrio la cual esta vez fue suplementada con iodo acetamida hasta una concentración de 2,5 %, se mantuvo por 15 minutos y posteriormente se transfirieron los strips a los geles de poliacrilamida al 12,5% y se agregó agarosa con trazas de azul de bromofenol en la parte superior del gel para seguir el frente de movimiento. Posteriormente los geles se instalaron en la cámara de segunda dimensión de BIO – RAD, se agregó solución de corrida Tris 25mM, glicina 192mM y SDS 10% hasta dejarlo a una concentración 0.1% P/V. Los geles fueron sometidos a un campo eléctrico de 60 V por 18 hrs.

#### **4.2.5 Tinción de los geles Bidimensionales.**

Para los geles preparativos (120 µg de proteínas por gel) los geles fueron teñidos con plata utilizando una modificación del protocolo de Yan y col (2000).

#### **4.2.6 Captura de imagen**

La imagen posteriormente fue captada por el programa GeneSnap de Syngene y almacenada bajo este formato de archivo (.sgd) y como archivo TIF para el análisis posterior de las imágenes

### 4.3 Análisis de los geles.

#### 4.3.1 Normalización de la Imagen

Para realizar la normalización de la imagen de los geles, se eligieron 18 proteínas que estuvieran presentes a lo largo y ancho de todo el gel en las 4 variedades, en las 2 condiciones y que presentaran un coeficiente de variación (CV) menor a 0.5 que es lo permitido para una variación técnica propia de la manipulación de los geles bidimensionales (Cloe y col 2003) (Molloy y col 2003).

El primer paso para calcular el CV, es medir el volumen cada una de las 18 proteínas (volumen = intensidad x Área) y medir el background propio de la imagen del gel. Al restar el background al volumen de la proteína se obtuvo el volumen ajustado (Vol Adj). Luego se calculó el porcentaje de volumen ajustado (% Vol Adj) usando el programa *Quantity one* (BIO – RAD), que es el valor en porcentaje que aporta cada una de las proteínas en relación al valor total de volumen de las 18 proteínas.

Una vez hecho esto para cada uno de los geles se puede calcular el CV. Para ello se calcula el promedio del valor de porcentaje de volumen ajustado de cada proteína en los seis geles (tres geles de la condición cosecha y tres de la condición madura) y posteriormente la desviación estándar y finalmente el CV que es la desviación estándar dividida por el promedio. El CV de cada una de las 18 proteínas no superó el valor límite de 0.5 y fueron utilizados para normalizar el valor de porcentaje de volumen ajustado de proteínas “candidatas” a presentar cambios significativos.

#### **4.3.2 Identificación de cambios cualitativos y cuantitativos**

Con los geles obtenidos se realizaron comparaciones viendo cambios entre cosecha y maduro para cada una de las variedades, así como también cambios en la acumulación de proteínas para la condición de cosecha de cada una de las variedades para buscar diferencias entre ellas.

Para realizar la comparación ya sea cosecha versus maduro, o variedad versus variedad, se incluye la proteína a estudiar, dentro de las 18 utilizadas para normalizar y se calcula el porcentaje de volumen ajustado (se tiene entonces 19 proteínas) y se compara con la misma proteína pero en los geles de la otra condición. Al valor promedio obtenido para cada proteína a estudiar, se le aplicó un análisis de t de student con un  $\alpha = 0.05$  para comparar los valores de cosecha versus maduro (análogamente para el caso variedad versus variedad), de este modo se determinó si el cambio fue significativo.

#### **4.3.3 Tinción y secuenciación de spots**

La técnica usada para secuenciar es MS/MS y fue realizada en el Centro de Proteómica de la Universidad de Cambridge. Para esto fue necesario enviar las proteínas escindidas de los geles teñidas con una tinción compatible con la técnica. Para ello se cargó en los geles una cantidad de 350  $\mu\text{g}$  de proteína total y se procedió a teñir con azul de Coomassie coloidal que presenta una menor sensibilidad que la plata, pero es altamente compatible con la secuenciación MS/MS.

#### 4.3.4 Identificación de las proteínas.

El análisis de la secuenciación se realizó utilizando el software MASCOT que a través de los péptidos que entrega el análisis por MS/MS es capaz de identificar el mejor "hit" de esos péptidos contra las bases de datos existentes. Para corroborar los datos entregados por MASCOT, los péptidos obtenidos de la secuenciación fueron analizados por medio del algoritmo tBLASTn usando la base de datos del proyecto genoma de duraznos consistente de cerca de 10.000 unigenes obtenidos a partir de la secuencia de 50.000 ESTs ([www.genomavegetal.cl](http://www.genomavegetal.cl)). En todos los casos hubo coincidencia en el mejor hit al comparar ambos análisis.

Para cada proteína identificada se buscó su secuencia aminoacídica completa y a través de la página [www.expasy.org](http://www.expasy.org) se calculó el peso molecular y el punto isoeléctrico de la proteína para realizar la comparación con su ubicación en el gel. El cálculo del peso molecular de la proteína en el gel se hizo utilizando marcadores de peso molecular y usando el Rf.

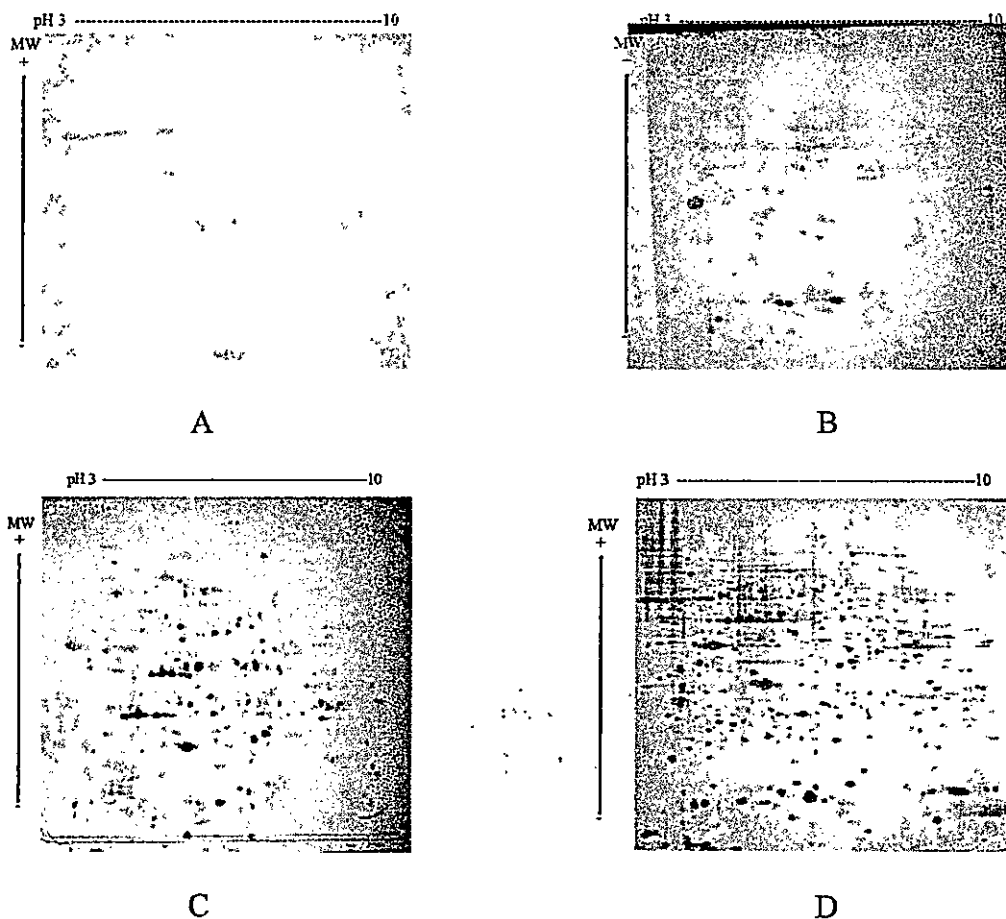
## 5.0 RESULTADOS

### 5.1.1 Separación de proteínas de duraznos y nectarines usando distintos protocolos de extracción.

La primera etapa de esta tesis consistió en obtener un protocolo de extracción eficiente que permitiera obtener el mejor rendimiento en cuanto a la relación tejido inicial/ proteínas y además que dicho protocolo permita obtener una alta resolución de las proteínas en un gel bidimensional (> a 200 proteínas). En una primera etapa se procedió a utilizar un protocolo basado en el uso de Triton X – 100, DTT y ácido tricloroactico (Figura 2A), sin embargo no se obtuvieron geles de alta calidad ni tampoco un alto rendimiento (aproximadamente 50 µg proteínas a partir de 2g de tejido), luego se procedió a utilizar un protocolo basado en el uso de SDS, β Mercaptoetanol (Figura 2B) y precipitaciones con acetona, sin embargo el rendimiento en este caso también fue bajo y la calidad de geles bidimensionales no fue óptima en cuanto a rendimiento y a número de spots visibles.

Finalmente se probó el protocolo descrito en materiales y métodos descrito por Holford y colaboradores el año 2002, a partir del cual se obtuvo un alto rendimiento (400 µg de proteínas a partir de 2g de tejidos) el cual fue optimizado en este trabajo, al resuspender las proteínas en un nuevo tampón (Urea 5M, Tiourea 2M, CHAPS 2% Y SB3- 10.2%, DTT 20mM, TCEP 5mM y anfolitos 4 – 6.5 :0.5% y de pH 3 – 10 : 0.25%) (Méchin y col, 2003), y no en el descrito por Holford (Urea 8M , Chaps 2%, DTT 20mM y anfolitos de pH 4 – 6.5 , 0.5%) (Figura 2 C y D)





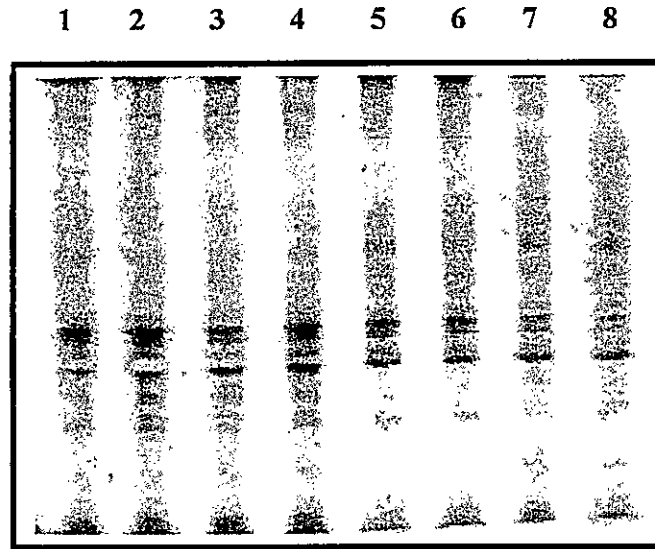
**Figura 2.- Separación de proteínas de duraznos y nectarines extraídas utilizando distintos protocolos .** En esta tesis se comenzó utilizando un protocolo basado en la extracción con Triton X - 100 y ácido tricloroacético (A), posteriormente se utilizó un protocolo que incluía glicerol,  $\beta$  Mercaptoetanol y SDS (B), hasta que se probó con uno basado en extracción fenólica (C), el cual fue optimizado en cuanto al uso del tampón de resuspensión de proteínas (D), en las imágenes se puede apreciar claramente la mejora en la resolución de los geles bidimensionales. Las proteínas fueron corridas en la primera dimensión con el protocolo descrito en la sección 4.2.2, separadas en un gel al 12,5% y posteriormente teñidas con plata según lo descrito en la sección 4.2.4

Como se puede apreciar en las imágenes de la figura 2, aumenta claramente el número de spots que se resuelven en los geles bidimensionales, en el caso de la figura 2A se aprecia que el número de proteínas no es superior a las 50, un caso similar ocurre en el caso del protocolo basado en glicerol y  $\beta$  Mercaptoetanol (Figura 2B), sin embargo al utilizar el protocolo descrito por Holford y colaboradores, se aprecia un aumento en el número de spots visibles en el gel (Figura 2C), sin embargo, las proteínas no estaban bien definidas en todo el rango de pH, lo que se ha descrito que puede deberse a un mal enfoque, producto de que el tampón de resuspensión no es el adecuado, considerando lo anterior se procedió a utilizar el tampón descrito en Materiales y Métodos (Mechin y col, 2002), el cual mejoro la calidad de los geles bidimensionales, observando aproximadamente 300 proteínas en cada gel.(Figura 2D).

### 5.1.2 Extracción de proteínas desde distintas variedades de duraznos y nectarines.

Con el fin de analizar los cambios que ocurren durante la maduración de frutos en el contenido de las proteínas en las variedades O'Henry, Elegant Lady, July Red y Ángelus, se implementó el protocolo de extracción de proteínas descrito en Materiales y Métodos. Este procedimiento permitió obtener aproximadamente 300  $\mu\text{g}$  de proteínas a partir de 2g de mesocarpo de los frutos. Este rendimiento se mantuvo constante independiente de la condición de postcosecha o de la variedad utilizada para extraer las proteínas.

Una vez extraídas las proteínas, estas fueron analizadas en un gel de poliacrilamida-SDS al 12,5%. Como se observa en la Figura 3, las proteínas presentan un patrón definido y de buena calidad, sin embargo la resolución obtenida en este gel de una dimensión no es suficiente para apreciar cambios significativos en las proteínas al comparar distintas variedades y condiciones estudiadas. Este resultado posiblemente es producto de la limitada resolución de un gel de una dimensión de 7 cm de longitud, además de la similitud genética que existe entre las variedades de *Prunus persica* en estudio. Con el fin de apreciar una mayor cantidad de proteínas, de manera de detectar cambios en el contenido de las proteínas a nivel de las variedades o durante la maduración de los frutos, se procedió a realizar geles bidimensionales los cuales son capaces de resolver un mayor número de proteínas en solo un gel. Utilizando esta metodología se logró resolver aproximadamente 300 proteínas de los frutos de duraznos y nectarines en un solo gel, lo que aumenta considerable la capacidad de análisis tanto a nivel de variedades como a nivel de condición de postcosecha

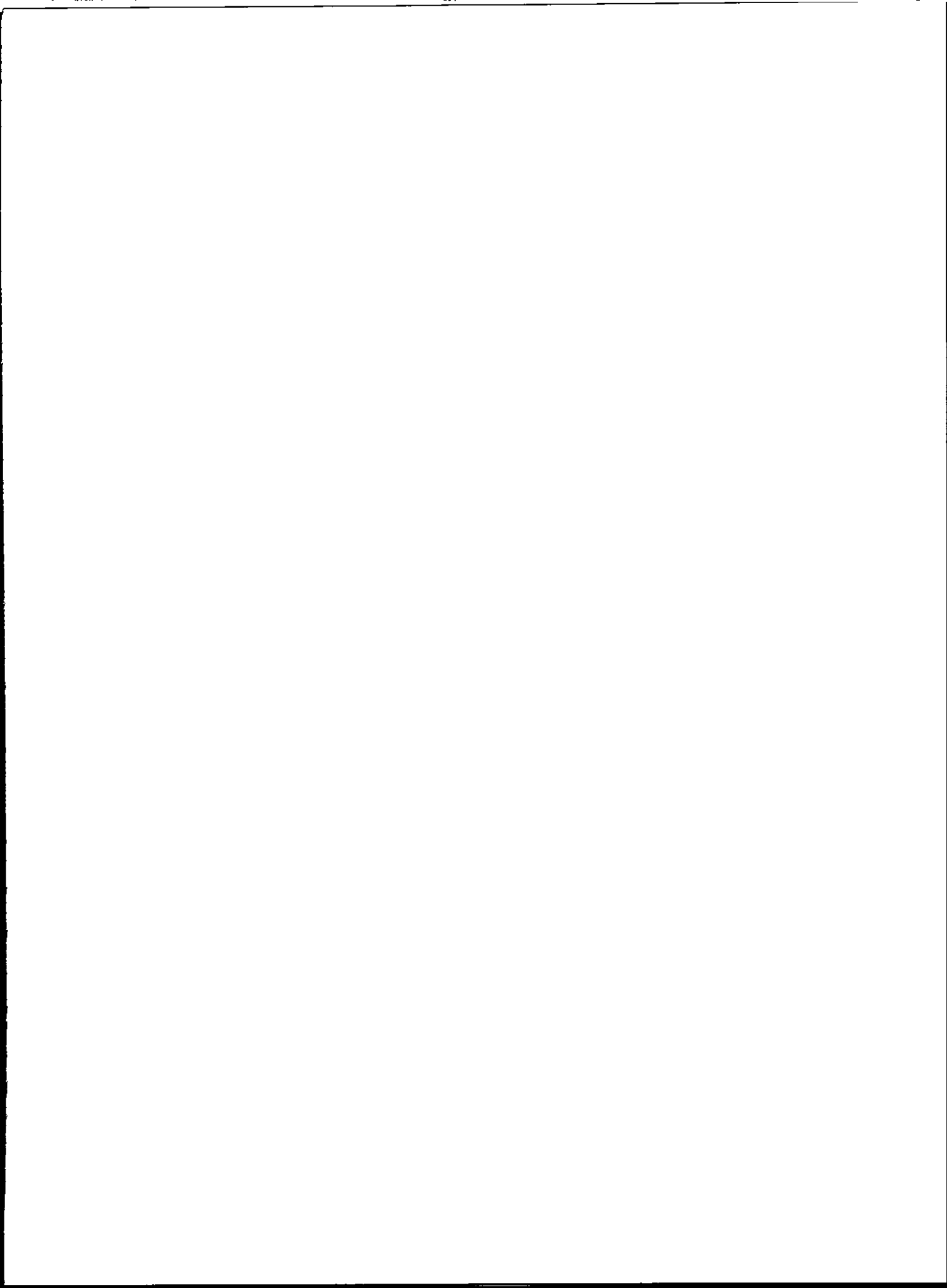


**Figura 3- Separación de proteínas obtenidas desde distintas variedades durante la maduración de frutos.** En un gel SDS 12.5% se separaron las proteínas provenientes del mesocarpo de frutos firmes (cosecha) o maduros de las distintas variedades. (1) cosecha y (2) maduro de la variedad O'Henry (3) cosecha y (4) maduro de la variedad Elegant lady; (5) cosecha (6) maduro de la variedad July Red, (7) cosecha (8) y maduro de la variedad Angelus. El gel fue cargado con 8 $\mu$ g de proteína por carril y se corrió a 100V por 90 minutos y posteriormente fue teñido con plata según el protocolo descrito en Materiales y Métodos.

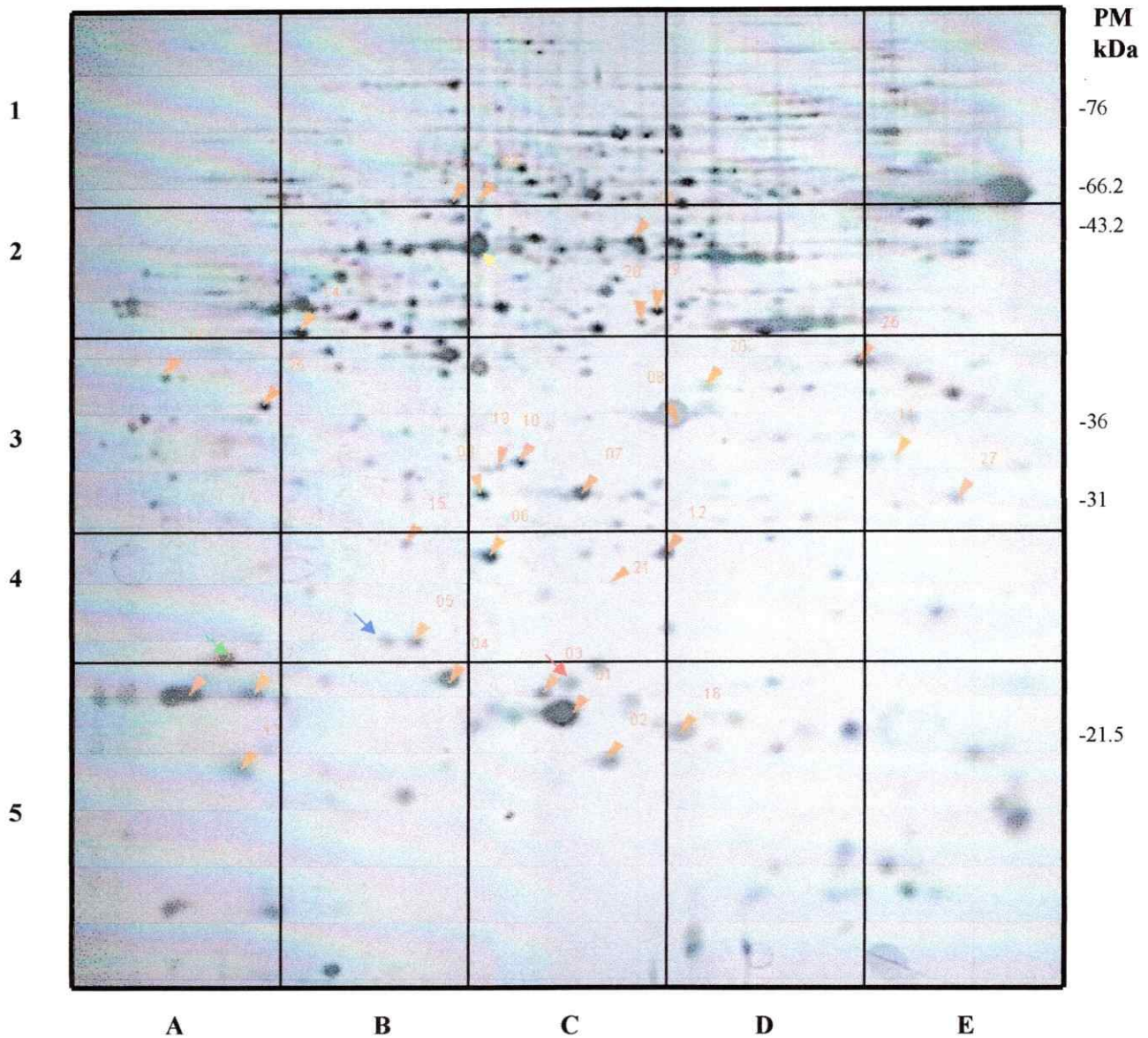
Para identificar cambios en el contenido de proteínas de las distintas variedades, se analizaron 3 geles bidimensionales los cuales se identificaron como c1, c2 y c3 para proteínas provenientes desde duraznos obtenidos desde la cosecha de cada variedad y como m1, m2, m3 para los geles donde se separaron las proteínas provenientes de duraznos maduros de cada variedad. En total se realizaron 24 geles (4 variedades x 2 estadios x 3 muestras biológicas = 24 geles). Para el análisis que se describe en esta tesis se muestra solo un gel representativo por condición y variedad, el cual fue fragmentado con un cuadrulado de 25 secciones para facilitar la comparación de los geles.

Cómo es sabido, una de las dificultades para la separación de proteínas en geles bidimensionales es la reproducibilidad entre los distintos geles, por esta razón, y con el fin de poder establecer entre los distintos geles comparaciones cualitativas y cuantitativas se procedió a identificar un número de proteínas que no cambió significativamente su contenido y que se utilizaron para normalizar la imagen. De esta forma se seleccionó un número de proteínas presentes en todas las condiciones analizadas y que presentaran un nivel constante de acumulación. Bajo esta premisa se seleccionaron 30 proteínas presentes en duraznos provenientes de cosecha y maduros, las que fueron analizadas en cada uno de los geles realizados para cada variedad. De esta forma para una variedad, cada proteína seleccionada para la estandarización fue analizada en 6 geles distintos. Inicialmente se analizaron 30 proteínas distintas, a las que se les calculó el coeficiente de variación, parámetro que permite discriminar si las proteínas seleccionadas permanecen constantes entre los geles. Dicho coeficiente se obtiene al dividir la desviación estándar del porcentaje de volumen ajustado de cada spot por el valor promedio del mismo. Al realizar este cálculo el resultado no fue superior a 0.5 para las proteínas seleccionadas en cada una de las variedades. Este número representa la máxima variación permitida para las desviaciones propias de los geles bidimensionales (Cloe y col 2003, Molloy y col 2003). De las 30 proteínas elegidas inicialmente, se seleccionó un número de 18 que están distribuidas a lo largo y ancho de los geles. Este grupo de proteínas fue utilizado para normalizar las imágenes, es así como se calculó el valor de porcentaje de volumen ajustado de las proteínas, determinando si existían diferencias significativas al comparar distintos estadios de maduración y diferentes variedades.

De modo de presentar los datos ordenadamente, se muestra primero los cambios en la acumulación de proteínas durante la maduración en O'Henry, luego Elegant Lady, posteriormente Angelus y finalmente July Red. Luego se muestra una comparación de variedades en el estadio de cosecha (es decir cosecha O'Henry v/s cosecha Elegant v/s cosecha de Angelus v/s cosecha de July Red), para analizar las diferencias de proteínas existentes entre las variedades mencionadas.



pH 10 -----3



**Figura 4(B).- Proteínas de durazno O’Henry en condición maduro.** Las proteínas fueron extraídas de acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y Métodos, y separadas por isoelectroenfoque en un gradiente de pH no lineal de 3 a 10 hasta alcanzar un voltaje hora aproximado a 69500. El enfoque de las proteínas se realizó en 23,5 horas a una temperatura de 20°C. Para la segunda dimensión las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 12,5% corrido a 50V durante 17 horas, a temperatura ambiente. Posteriormente las proteínas fueron teñidas con plata según lo descrito en Materiales y Métodos. A la derecha de los gels se muestra el peso molecular relativo de las proteínas. Los gels fueron divididos en 25 cuadrantes para ser analizados. Con las flechas naranjas se señalan 30 spots que al ser comparados con los mismos en la condición de cosecha poseen un C.V menor a 0.5. Con flechas de otro color se señala la posición de proteínas que cambian significativamente



Al analizar las imágenes de las proteínas extraídas desde O'Henry, se observa un número aproximado de 300 proteínas por gel. Estas se encuentran distribuidas a lo largo de todo el gradiente de pH desde el extremo ácido al básico y en todo el rango de peso molecular.

Como se mencionó anteriormente se eligieron 30 proteínas mayoritarias, señaladas con flechas de color en la Figura 4 (A) y (B), las que al ser analizadas mostraron valores similares de porcentaje de volumen ajustado, determinando que el coeficiente de variación para los 30 spots provenientes de esta variedad no superaban el valor de 0,5. Como se muestra en la Tabla 2 tan solo los spots 14, 22, 24 y 25 están cerca del límite permitido, pero ninguno lo supera, oscurecidos en la tabla se muestran los elegidos para normalizar la imagen.

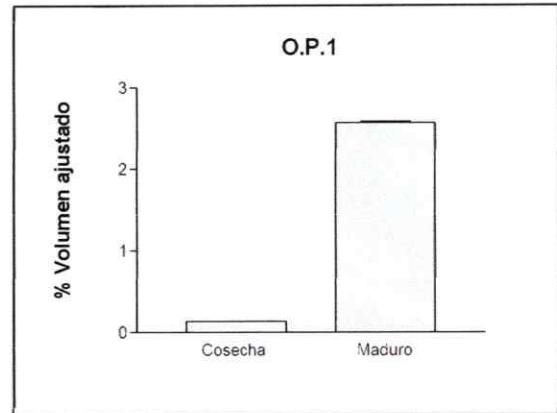
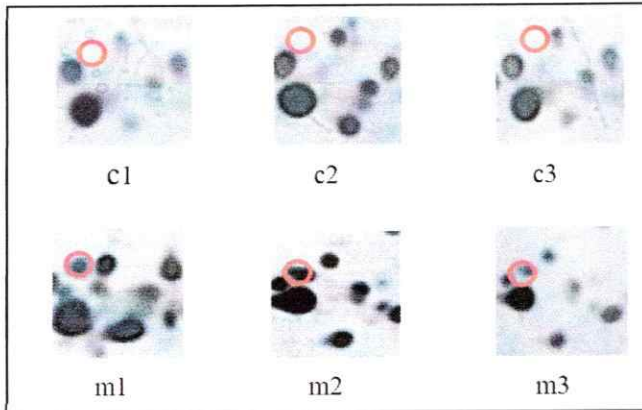
Tabla 2.- Determinación del coeficiente de variación de 30 spots en los seis geles bidimensionales de la variedad O'Henry. Utilizando el programa Quantity one se determinó el porcentaje de volumen ajustado de cada uno de los 30 spots indicados en la Figura 2 para los tres geles bidimensionales de proteínas extraídas de frutos en estado de cosecha y de tres geles de frutos en estado maduro. En la primera columna se muestra el número del spot, en la segunda columna se muestra el promedio de volumen ajustado de ese spot en los seis geles a continuación su desviación estándar y el coeficiente de variación (CV) que es la razón entre la desviación y el promedio.

Spot N°	Promedio O'Henry	Desv Est	Coeficiente de variación
	n = 6 geles % Volumen ajustado	D.E	CV = D.E/Promedio
1	11,48	2,20	0,19
2	4,97	1,27	0,26
3	6,06	1,20	0,20
4	3,75	0,44	0,12
5	4,27	0,70	0,16
6	3,18	0,92	0,29
7	3,09	0,92	0,30
8	12,43	1,59	0,13
9	1,58	0,32	0,20
10	1,46	0,56	0,39
11	2,06	0,50	0,24
12	4,72	1,70	0,36
13	6,39	1,10	0,17
14	2,14	0,97	0,45
15	2,32	0,59	0,26
16	3,47	1,30	0,37
17	1,23	0,26	0,21
18	2,05	0,52	0,25
19	2,20	0,42	0,19
20	1,61	0,43	0,27
21	2,80	1,13	0,40
22	3,26	1,50	0,46
23	3,27	0,71	0,22
24	1,12	0,56	0,49
25	1,67	0,78	0,47
26	1,75	0,45	0,26
27	2,72	1,06	0,39
28	0,94	0,34	0,36
29	1,44	0,17	0,12
30	0,72	0,18	0,25

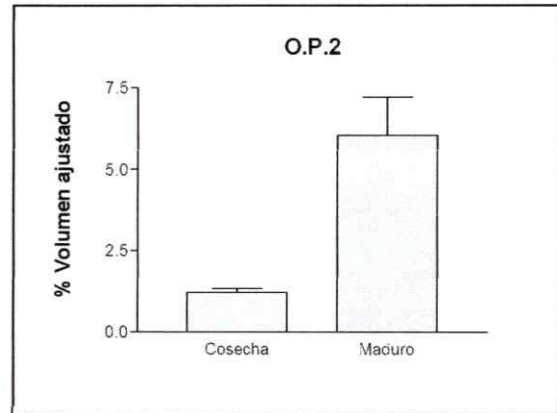
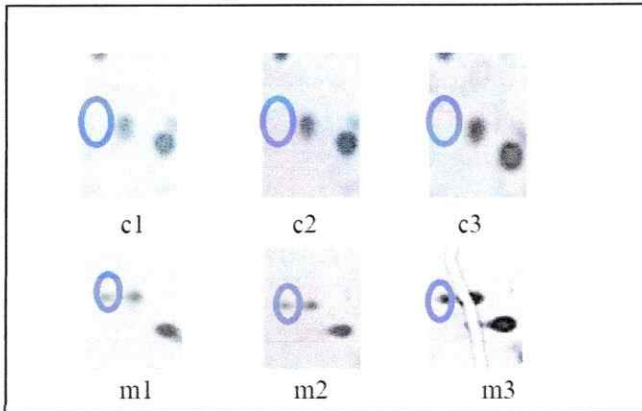
\*En las celdas oscurecidas se muestran los valores de las 18 proteínas utilizadas para normalizar la imagen

Al analizar las imágenes (Figura 4 A y B) se observan patrones muy similares al comparar ambas condiciones. Se puede apreciar que no existe una gran cantidad de proteínas que muestren diferencias del tipo “todo o nada”, lo que sugiere que probablemente durante el proceso de maduración de O’Henry los cambios fisiológicos y organolépticos que se observan son debidos en su gran mayoría a disminuciones o aumentos cuantitativos en la acumulación de proteínas. En la Figura 5, se observan las proteínas denominadas **O.P.1** (O’Henry Proteína 1), **O.P.2**, **O.P.3** y **O.P.4**, que muestran cambios significativos entre las condiciones de cosecha y madurez, en donde O.P.1, O.P.2, O.P.3 y O.P.4 se encuentran acumuladas en esta última condición, indicando que pese a los pocos cambios que se observan, hay una tendencia favorable a la acumulación de proteínas en los frutos maduros, situación que daría cuenta de cambios que ocurren en la maduración como son el ablandamiento o la mayor producción de etileno por nombrar algunos.

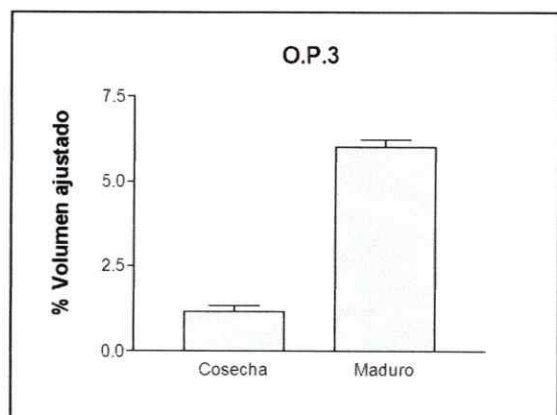
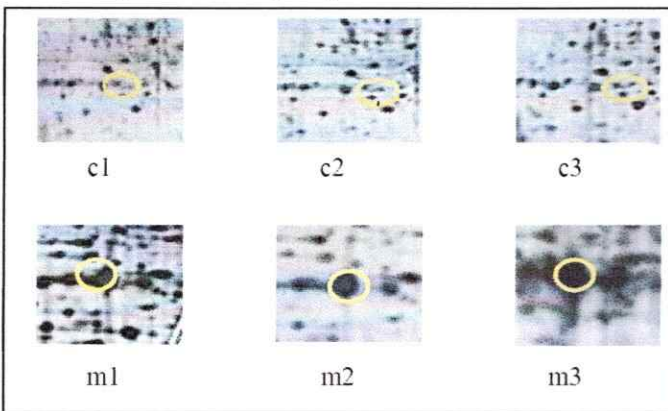
### O.P.1 (Sección C4.C5)



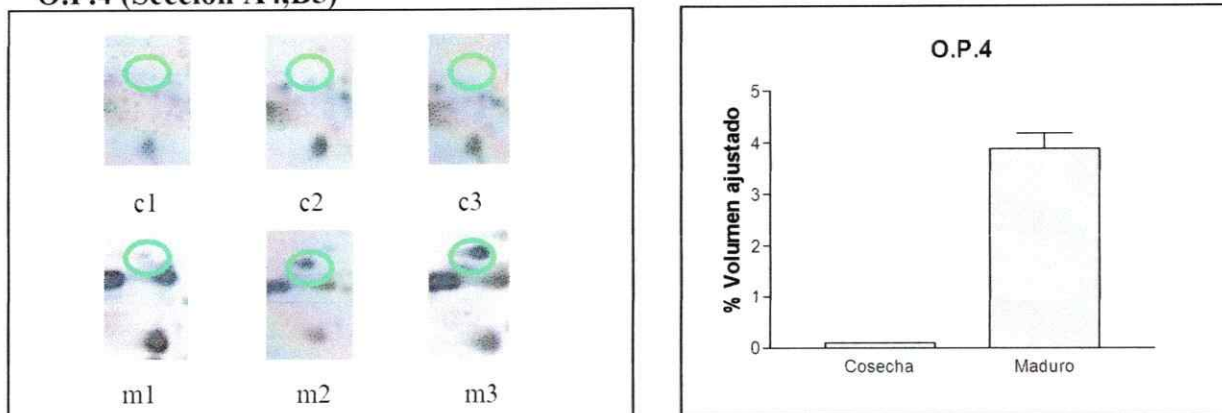
### O.P.2 (Sección 4B)



### O.P.3 (Sección B2, C2)



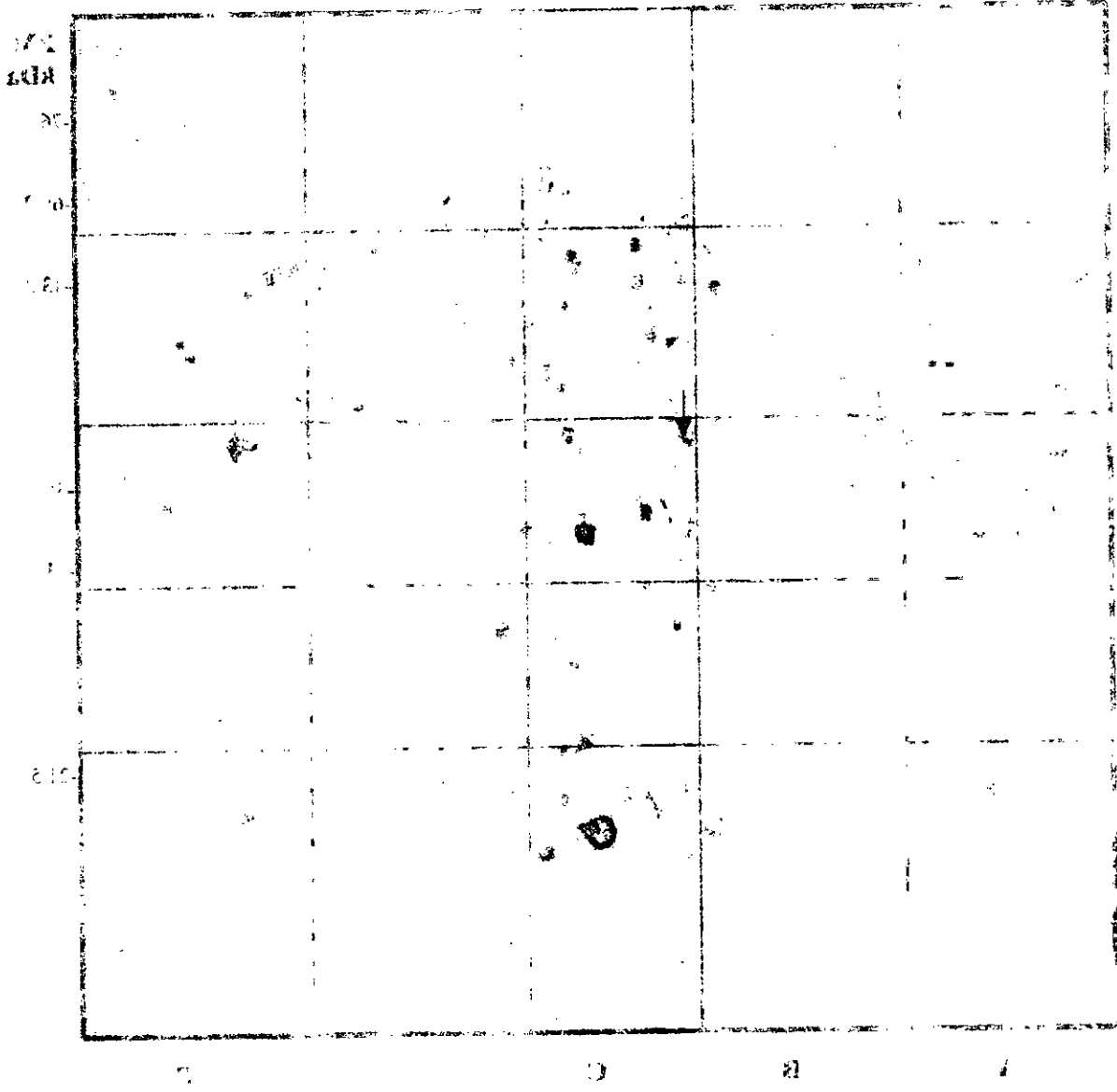
#### O.P.4 (Sección A4,B5)



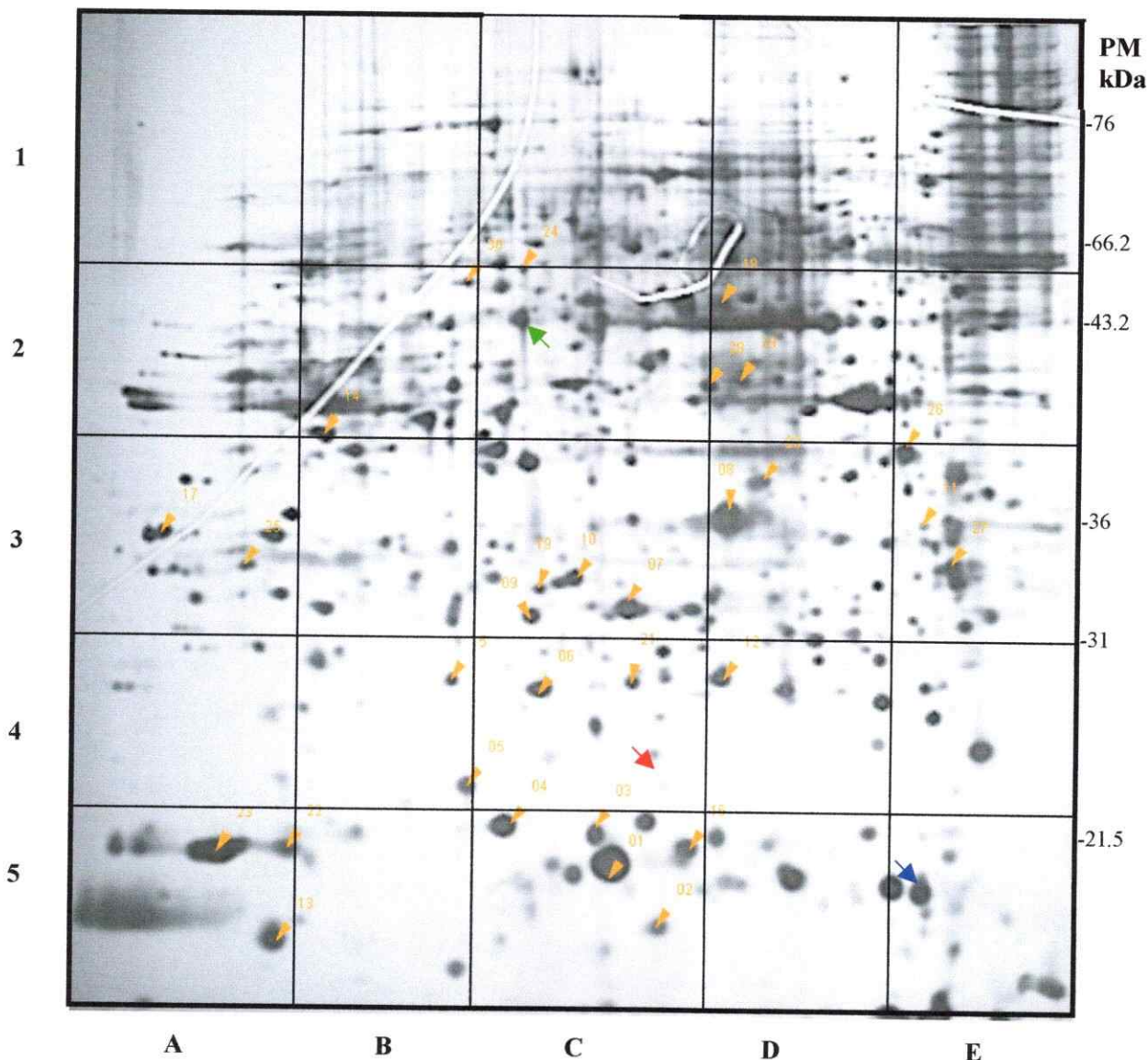
**Figura 5. Proteínas que cambian su grado de acumulación en las dos condiciones de postcosecha. O.P.1, O.P.2, O.P.3 y O.P.4.-** En los paneles que acompañan los gráficos se muestra las secciones de los tres geles realizados para cada estadio, en donde se localiza la proteína. Debajo de cada imagen se muestra la letra del gel correspondiente; c1, c2, c3 para cosecha y m1, m2, m3 para los geles de proteínas extraídas en duraznos maduros. Sobre las imágenes se coloca el nombre del spot y la sección del cuadrulado en que se encuentra. En el caso de O.P.1, la sección corresponde a C3, C4, para O.P.2 a la sección A3, para O.P.3 la sección es B2, B3 y para O.P.4 la sección es A4, B5 del cuadrulado mostrado en la Figura 4. El gráfico de barra muestra la cuantificación del spot en dichos geles y su desviación estándar en ambas condiciones, las diferencias son significativas (t – student)

Del mismo modo como se analizaron los cambios en la variedad O'Henry, se analizaron los cambios en la acumulación de proteínas en las variedades Elegant Lady, July Red y Ángelus.

1971



El efecto de la temperatura en la actividad de la enzima se puede observar en el gráfico. La actividad de la enzima aumenta con la temperatura hasta un punto óptimo de 30°C, después de lo cual disminuye. Esto se debe a que a altas temperaturas la enzima se desnaturaliza y pierde su actividad. Con las condiciones adecuadas de pH y temperatura, la actividad de la enzima puede ser maximizada. En este caso, la actividad de la enzima se midió en RPM (Revoluciones Por Minuto) y se observó un aumento de la actividad a medida que la temperatura aumentaba hasta 30°C, donde alcanzó su punto máximo. Después de esto, la actividad de la enzima disminuyó significativamente a 40°C y 50°C.



**Figura 6 (B).- Proteoma de durazno Elegant Lady en condición maduro.** Las proteínas fueron extraídas de acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y Métodos, y separadas por isoelectroenfoque en un gradiente de pH no lineal de 3 a 10 hasta alcanzar un voltaje hora aproximado a 69500 demorando 23,5 horas a 20°C, luego se separaron en un gel de poliacrilamida al 12,5% corrido a 50V durante 17 horas a temperatura ambiente y posteriormente teñidas con plata según lo descrito en Materiales y Métodos. A la derecha de los geles se muestra el peso molecular relativo de las proteínas. Los geles fueron divididos en 25 cuadrantes para ser analizados. Con las flechas naranjas, se señalan los 30 spots que al ser comparados con los mismos en la condición cosecha poseen un C.V menor a 0.5. Con flechas de otro color se señala la posición de proteínas que cambian significativamente

Al igual que en la variedad anterior, se escogieron 30 proteínas (las mismas elegidas para la variedad O'Henry) las que están señaladas con flecha en la Figura 6 (A) y (B). Estas proteínas tampoco presentaron un coeficiente de variación superior a 0,5 (Tabla 3) entre los geles de cosecha y maduro. Si a esto le agregamos que los patrones de distribución de las proteínas en ambas condiciones son similares y que es difícil identificar cambios cualitativos, se puede suponer que al igual que para la variedad anterior, los cambios que experimenta el fruto son debido en gran parte a diferencias cuantitativas de algunas proteínas.

A pesar de lo anterior, al analizar las imágenes provenientes de la maduración de esta variedad se encuentra una serie de cambios drásticos en la acumulación de proteínas, es el caso de E.P.1 (Elegant lady Proteína 1), E.P.2 y E.P.3, en donde apreciamos que E.P.1 está más acumulada en cosecha a diferencia de E.P.2 y E.P.3 que está más acumulada en la condición de maduro como se muestra en la Figura 7.

Si comparamos las posiciones relativas según peso molecular y punto isoelectrico entre E.P.3 y O.P.3 podemos decir que corresponden a la misma proteína y que ambas se encuentran más acumuladas en la condición madura, indicando comportamientos similares entre ambas variedades, sin embargo al comparar O.P.1, O.P.2 y O.P.4 con las otras proteínas que cambian en Elegant lady observamos que no hay correspondencia lo que muestra que hay cambios propios de cada variedad, que posiblemente permitan aprender sobre las diferencias fisiológicas que se presentan en la maduración entre las dos variedades mencionadas.

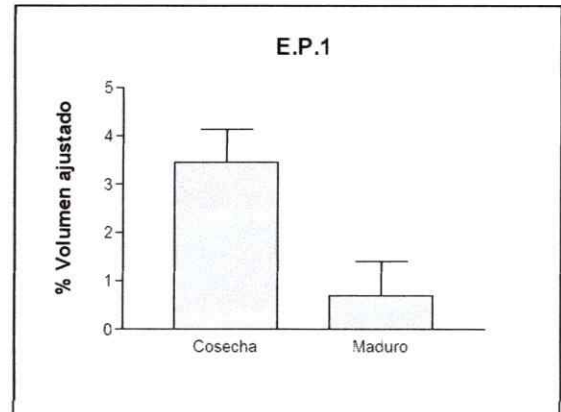
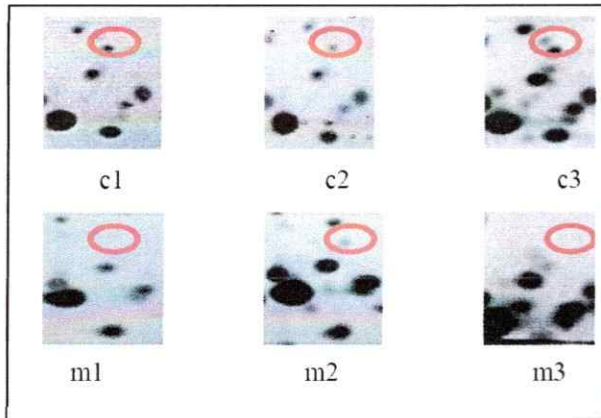


**Tabla 3.- Determinación del coeficiente de variación de 30 spots mayoritario en los seis geles bidimensionales de la variedad Elegant Lady. Utilizando el programa Quantity one se determino el porcentaje de volumen ajustado de cada uno de los 30 spots indicados en la Figura 2 para 3 los geles bidimensionales de proteínas extraídas de frutos en estado de cosecha y de 3 geles de frutos en estado maduro. En la primera columna se muestra el número del spot, en la segunda columna se muestra el promedio de volumen ajustado de ese spot en los seis geles a continuación su desviación estándar y el coeficiente de variación (CV) que es la razón entre la desviación y el promedio.**

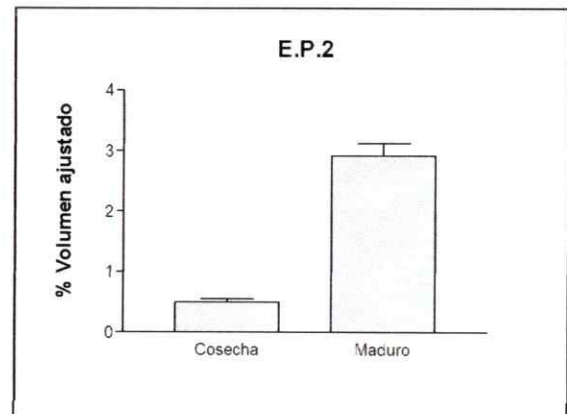
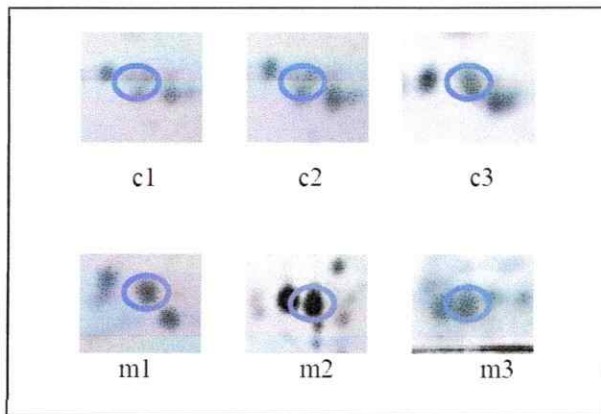
Spot N°	Promedio Elegant lady n = 6 geles % Volumen Ajustado	Desv Est D.E	Coeficiente de variación CV = D.E/Promedio
1	12,60	4,00	0,32
2	4,75	0,65	0,14
3	4,42	0,74	0,17
4	5,23	0,58	0,11
5	4,52	1,27	0,28
8	4,58	1,22	0,27
6	2,99	1,06	0,35
7	12,93	3,86	0,30
9	2,75	0,83	0,30
10	1,79	0,14	0,08
11	1,93	0,72	0,38
12	2,37	0,66	0,28
13	3,33	1,25	0,38
14	1,69	0,70	0,41
15	3,03	1,28	0,42
16	3,41	1,12	0,33
17	1,19	0,48	0,40
18	2,21	0,49	0,22
19	2,29	0,99	0,43
20	2,42	0,97	0,40
21	3,37	1,59	0,47
22	2,77	1,00	0,36
23	1,64	0,32	0,20
24	2,25	0,95	0,42
25	1,53	0,72	0,47
26	1,56	0,82	0,52
27	2,26	0,46	0,20
28	1,69	0,78	0,46
29	1,46	0,44	0,30
30	0,99	0,41	0,42

\*En las celdas oscurecidas se muestra el valor de las 18 proteínas utilizadas para normalizar la imagen.

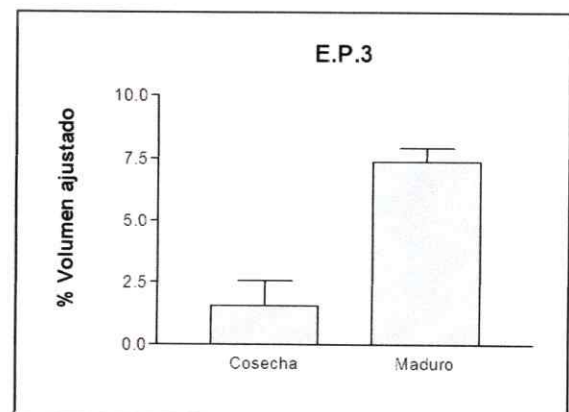
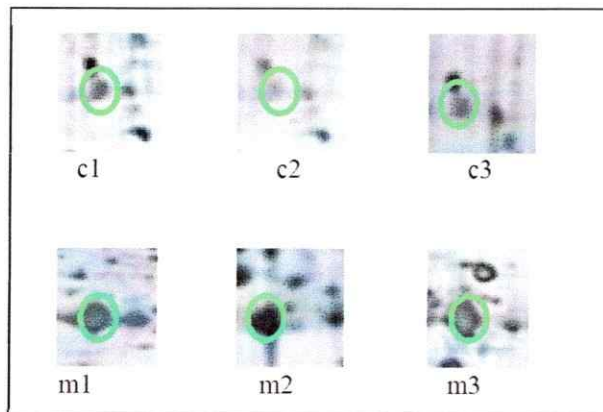
### E.P.1 (Sección C4)



### E.P.2 (Sección E5)



### E.P.3 (Sección C2)



**Figura 7. Análisis spots que cambian su grado de acumulación en las dos condiciones de postcosecha. E.P.1, E.P.2, E.P.3.-** En los paneles que acompañan los gráficos se muestra las secciones de los tres geles realizados por condición en donde se encuentra el spot. Debajo de cada imagen se muestra la letra del gel correspondiente; c1, c2, c3 para cosecha y m1, m2, m3 para los geles de proteínas extraídas en duraznos maduros. Sobre las imágenes se coloca el nombre del spot y la sección del cuadrículado en que se encuentra. En el caso de E.P.1 la sección corresponde a C4, para E.P.2 a la sección E5, y para E.P.3 la sección es C2 para del cuadrículado mostrado en la Figura 6, el gráfico de barra muestra la cuantificación del spot en dichos geles y su desviación estándar en ambas condiciones, las diferencias son significativas (t - student)

Hasta este momento se han analizado dos variedades de duraznos en las cuales se encuentran cambios significativos en el perfil de acumulación de proteínas, en el siguiente caso se quiso estudiar el comportamiento del nectarin July Red en las dos condiciones estudiadas, los análisis se muestran a continuación.

1 2 3 4

5 6 7 8

9

10 11 12 13

14

15

16 17 18 19

20

21

22

23

24

25

26

27

28 29

30 31 32

33

34

35

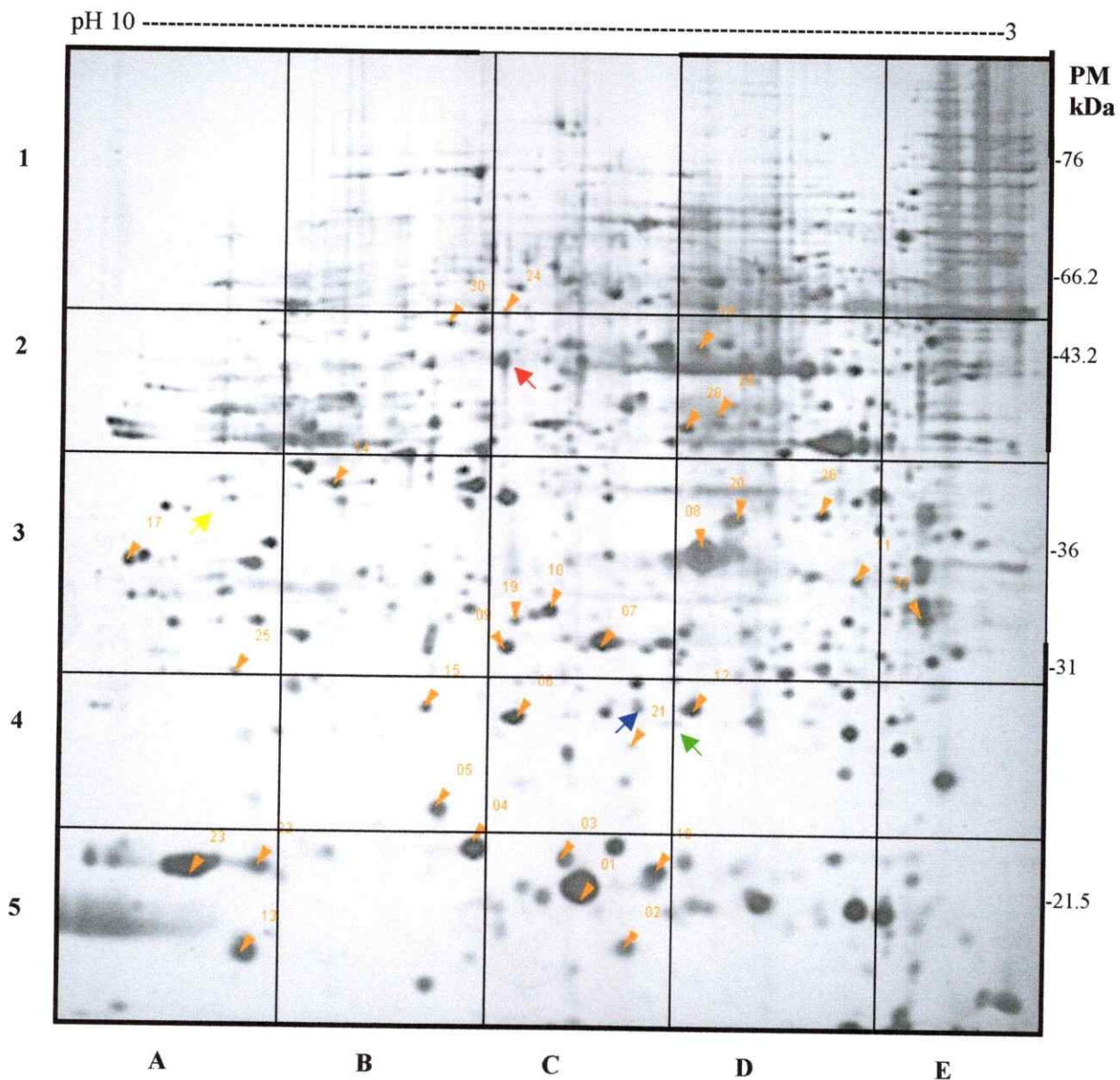
36

37

38

39

40



**Figura 8 (B).- Proteínas del nectarín July Red en condición maduro.** Las proteínas fueron extraídas de acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y Métodos, y separadas por isoelectroenfoque en un gradiente de pH no lineal de 3 a 10 hasta alcanzar un voltaje hora aproximado a 69500. La separación se realizó por un tiempo de 23,5 horas a una temperatura de 20°C. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 12,5% corrido a 50V durante 17 horas a temperatura ambiente y posteriormente se tiñeron con plata según lo descrito en Materiales y Métodos. A la derecha de los gels se muestra el peso molecular relativo de las proteínas. Los gels fueron divididos en 25 cuadrantes para ser analizados. Con las flechas naranjas se señalan los 30 spots que al ser comparados con los mismos en la condición de cosecha poseen un C.V menor a 0.5. Con flechas de otro color se señala la posición de proteínas que cambian significativamente

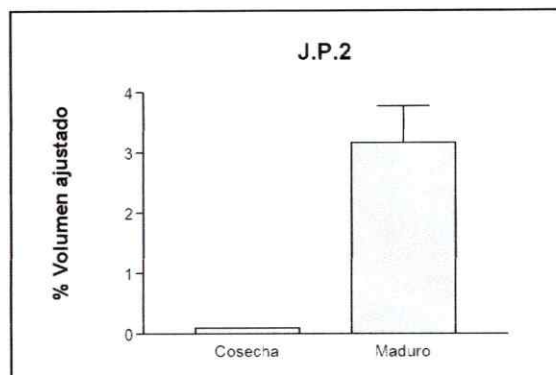
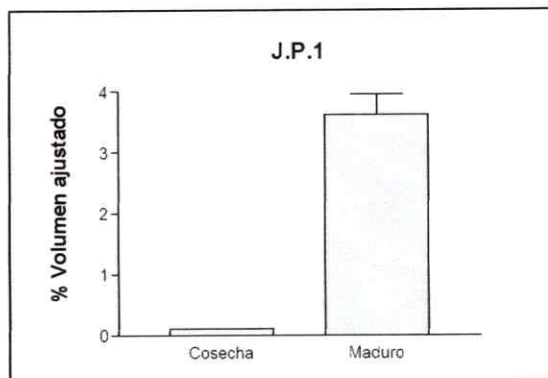
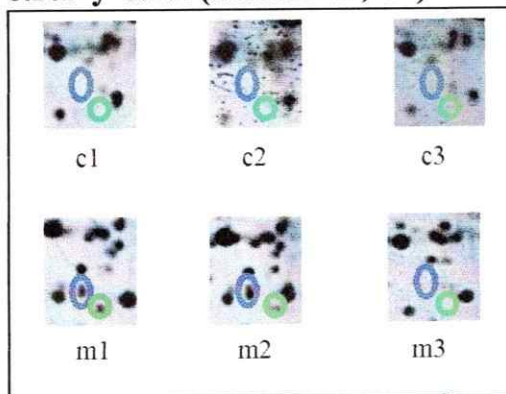
Al igual que en las variedades O'Henry y Elegant lady se escogieron las mismas 30 proteínas que no presentaron un coeficiente de variación superior a 0,5 (Tabla 4). Como se puede apreciar en la Figura 9, J.P.1 (July Proteína 1), J.P.2, J.P.3 y J.P.4. presentan una mayor acumulación los geles bidimensionales provenientes de proteínas de nectarines maduros No fue posible encontrar proteínas que se acumularan en la etapa de cosecha y no en el nectarín maduro.

**Tabla 4.- Determinación del coeficiente de variación de 30 spots mayoritario en los seis geles bidimensionales de la variedad July Red. Utilizando el programa Quantity one se determino el porcentaje de volumen ajustado de cada uno de los 30 spots indicados en la Figura 2 para 3 los geles bidimensionales de proteínas extraídas de frutos en estado de cosecha y de 3 geles de frutos en estado maduro. En la primera columna se muestra el número del spot, en la segunda columna se muestra el promedio de volumen ajustado de ese spot en los seis geles a continuación su desviación estándar y el coeficiente de variación (CV) que es la razón entre la desviación y el promedio.**

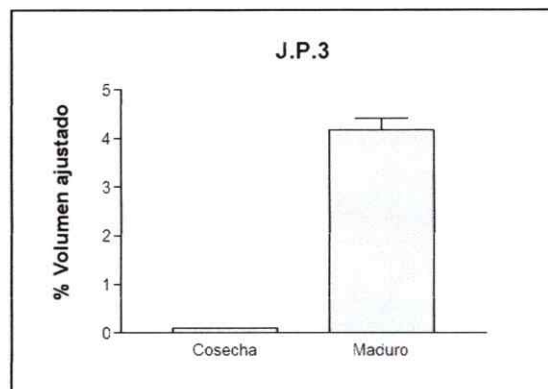
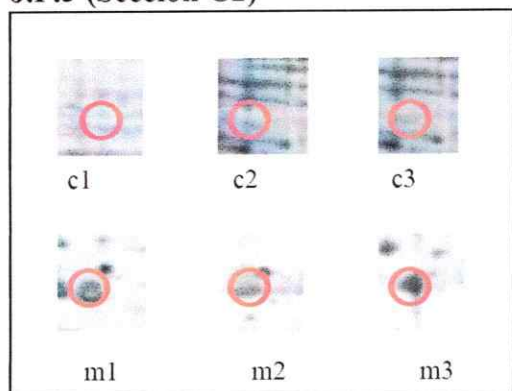
Spot N°	Promedio July Red	Desv Est	Coeficiente de variación.
	n = 6 geles	D.E	CV = D.E/promedio
1	12,41	2,43	0,20
2	4,30	0,42	0,10
3	4,48	0,99	0,22
4	4,58	0,87	0,19
5	2,96	0,66	0,22
6	3,39	0,98	0,29
7	3,07	0,87	0,28
8	14,58	2,15	0,15
9	2,16	0,69	0,32
10	1,77	0,49	0,28
11	2,00	0,87	0,44
12	3,38	1,39	0,41
13	3,11	0,93	0,30
14	2,63	1,02	0,39
15	3,18	0,84	0,27
16	2,42	0,68	0,28
17	1,54	0,74	0,48
18	2,65	0,27	0,10
19	2,53	1,65	0,65
20	2,77	0,98	0,36
21	2,94	0,74	0,25
22	3,00	0,72	0,24
23	1,56	0,58	0,38
24	1,72	0,61	0,35
25	1,99	0,86	0,43
26	1,53	0,54	0,35
27	3,19	1,45	0,45
28	1,38	0,60	0,43
29	1,44	0,55	0,38
30	1,37	0,50	0,36

\*En las celdas oscurecidas se muestra el valor de las 18 proteínas utilizadas para normalizar la imagen

**J.P.1 y J.P.2 (Sección C3, C4)**

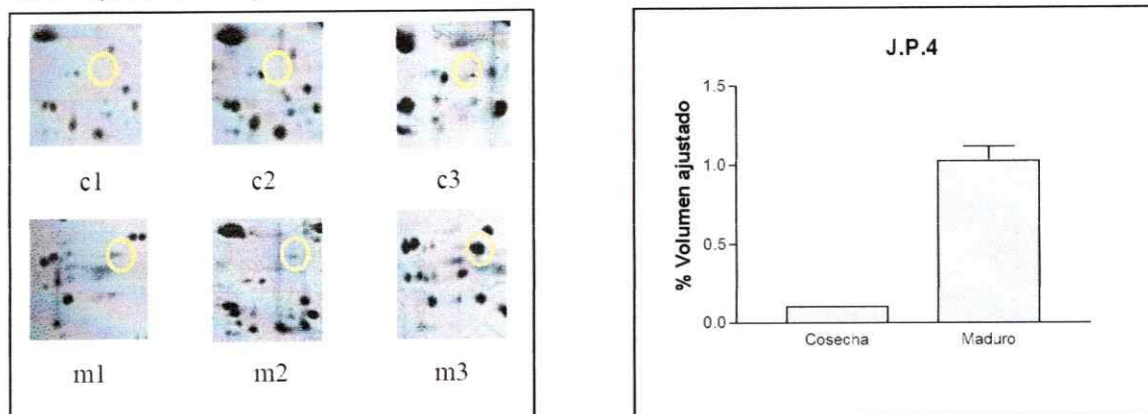


**J.P.3 (Sección C2)**





### J.P.4 (Sección A3)



**Figura 9. Análisis spots que cambian su grado de acumulación en las dos condiciones de postcosecha. J.P.1, J.P.2, J.P.3 y J.P.4.-** En los paneles que acompañan los gráficos se muestra las secciones de los tres geles realizados por condición en donde se encuentra el spot. Debajo de cada imagen se muestra la letra del gel correspondiente; c1, c2, c3 para cosecha y m1, m2, m3 para los geles de proteínas extraídas en duraznos maduros. Sobre las imágenes se coloca el nombre del spot y la sección del cuadrulado en que se encuentra en el caso de J.P.1 y J.P.2 la sección corresponde a C3, C4, para J.P.3 a la sección C2, y para J.P.4 la sección es A3 para del cuadrulado mostrado en la Figura 8, el gráfico de barra muestra la cuantificación del spot en dichos geles y su desviación estándar en ambas condiciones, las diferencias son significativas (t – student)

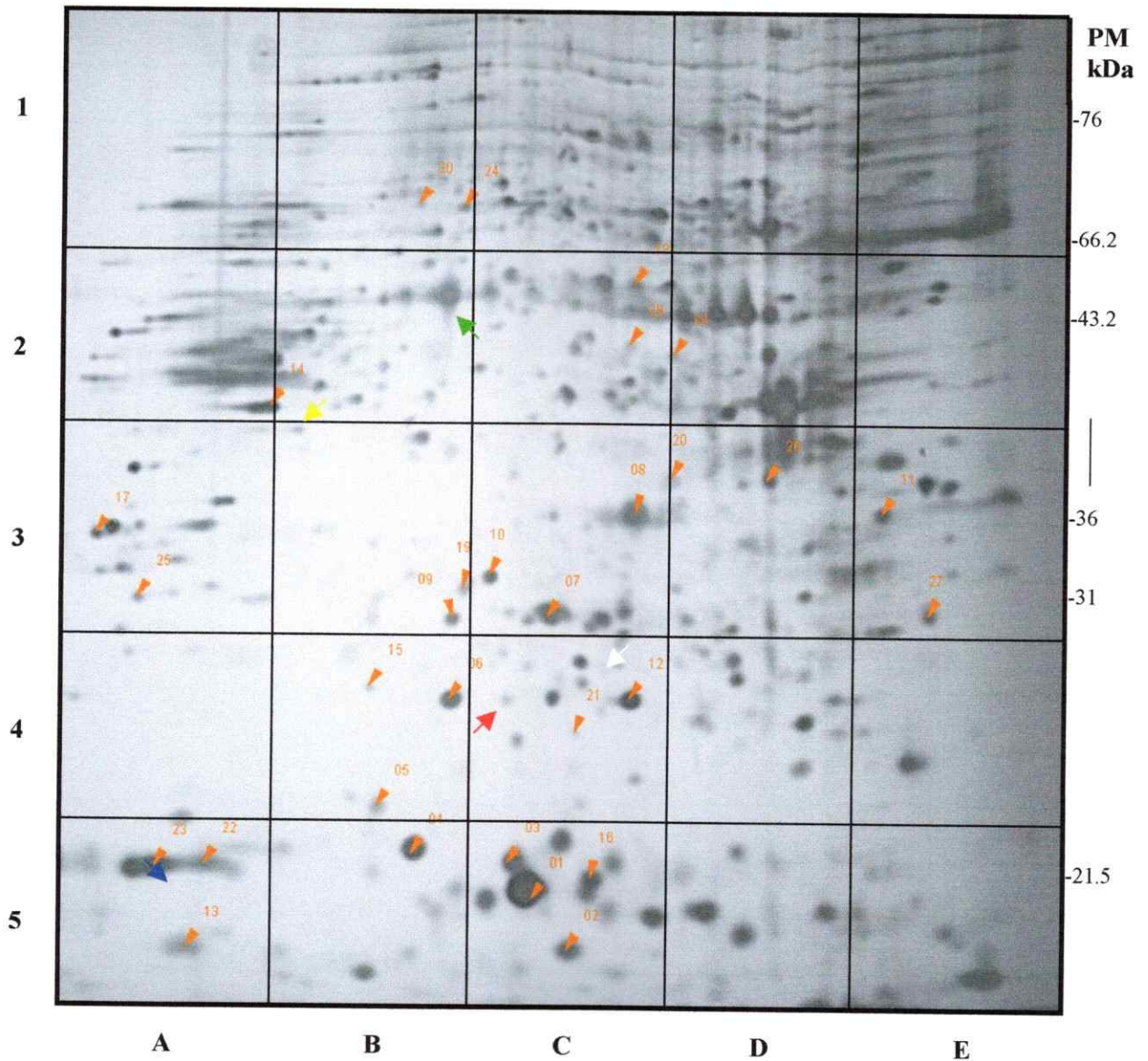
Al observar los cambios durante la maduración del nectarín July Red, se aprecia que la proteína denominada **J.P.3**, corresponde por peso molecular y punto isoelectrico a O.P.3 y E.P.3 de las variedades O'Henry y Elegant Lady respectivamente, lo que sugiere que el perfil de acumulación de esta proteína es común entre las variedades mencionadas.

Las proteínas **J.P.1** y **J.P.2** se encuentran acumuladas en los frutos maduros de este nectarín. En otras variedades se observan proteínas con el mismo punto isoelectrico y peso molecular, que poseen un comportamiento similar, sin embargo la diferencia es significativa solo en July Red, mostrando nuevamente que existen cambios comunes en la acumulación de proteínas durante la maduración de los frutos, pero no necesariamente en la misma proporción, característica que probablemente nos permite aprender de las

diferencias varietales. Finalmente, la proteína **J.P.4** se encuentra acumulada en la condición maduro de July Red y no en las otras variedades, mostrando claramente una diferencia varietal.

Finalmente para completar el análisis de las proteínas que cambian durante la maduración, se observó el comportamiento de las proteínas de la variedad Ángelus en las dos condiciones de postcosecha ya descritas.





**Figura 10 (B).- Proteínas del durazno *Angelus* en condición maduro.** Las proteínas fueron extraídas de acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y Métodos, y separadas por isoelectroenfoque en un gradiente de pH no lineal de 3 a 10 hasta alcanzar un voltaje hora aproximado a 69500. La separación se realizó en un lapso de 23,5 horas a 20°C. Luego las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 12,5% corrido a 50V durante 17 horas a temperatura ambiente y posteriormente teñidas con plata según lo descrito en Materiales y Métodos. A la derecha de los gels se muestra el peso molecular relativo de las proteínas. Los gels fueron divididos en 25 cuadrantes para ser analizados. Con las flechas naranjas se señalan 30 spots que no cambian al compararlos con la condición de cosecha. Con flechas de otro color se señala la posición de proteínas que cambian significativamente

En el caso de esta variedad, observamos patrones de distribución de proteínas similares a los encontrados anteriormente en las otras variedades para las condiciones de cosecha y maduro, y también un número aproximado de 300 proteínas.

Al calcular el coeficiente de variación (Tabla 5) de las 30 proteínas presentes tanto en los geles de cosecha como maduro se encontró que ninguno de ellos superaba el valor límite de 0,5, a partir de esto podemos decir que las 30 proteínas seleccionadas en los geles de ambas condiciones, que como puede notarse fueron los mismos en las cuatro variedades, no varían durante la maduración del fruto, independiente de la variedad que estuviera en estudio. Esto es importante porque estas proteínas pueden estar relacionadas con metabolismo basal del fruto ya que permanecen inalteradas independiente de la variedad o de la condición de postcosecha. La secuenciación de estas proteínas entregaría gran cantidad de información sobre la fisiología del fruto de *Prunus persica*.

**Tabla 5.- Determinación del coeficiente de variación de 30 spots mayoritario en los seis geles bidimensionales de la variedad Angelus. Utilizando el programa Quantity one se determino el porcentaje de volumen ajustado de cada uno de los 30 spots indicados en la Figura 2 para 3 los geles bidimensionales de proteínas extraídas de frutos en estado de cosecha y de 3 geles de frutos en estado maduro. En la primera columna se muestra el número del spot, en la segunda columna se muestra el promedio de volumen ajustado de ese spot en los seis geles, a continuación su desviación estándar y el coeficiente de variación (CV) que es la razón entre la desviación y el promedio.**

	Promedio Angelus	Desv Est	Coeficiente de variación
	n = 6 geles	D.E	C.V = D.E/ Promedio
Spot N°	% Volumen ajustado		
1	10,37	1,50	0,14
2	4,11	1,09	0,26
3	4,89	0,65	0,13
4	5,76	1,44	0,25
5	5,28	0,57	0,11
6	3,90	1,01	0,26
7	3,99	1,12	0,28
8	14,44	4,32	0,30
9	2,78	0,87	0,31
10	1,90	0,51	0,27
11	2,45	0,97	0,40
12	2,66	1,17	0,44
13	2,55	1,05	0,41
14	2,70	0,96	0,35
15	2,54	1,04	0,41
16	2,16	1,02	0,47
17	1,54	0,70	0,46
18	2,89	1,18	0,41
19	2,51	1,04	0,42
20	2,70	0,77	0,29
21	2,22	0,69	0,31
22	2,09	0,52	0,25
23	1,76	0,74	0,42
24	1,45	0,43	0,30
25	1,88	0,84	0,45
26	2,14	1,04	0,49
27	1,75	0,82	0,47
28	1,66	0,63	0,38
29	1,56	0,49	0,31
30	1,38	0,63	0,46

\*En las celdas oscurecidas se muestra el valor de las 18 proteínas utilizadas para normalizar la imagen

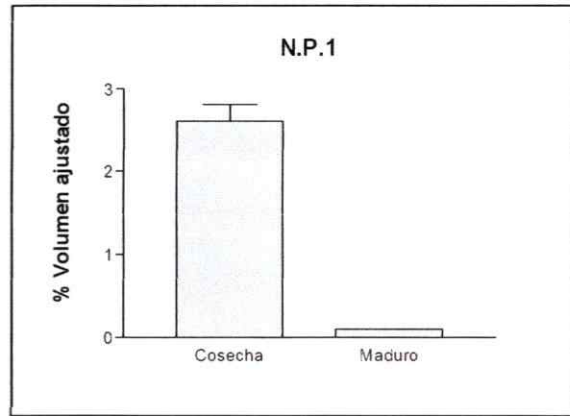
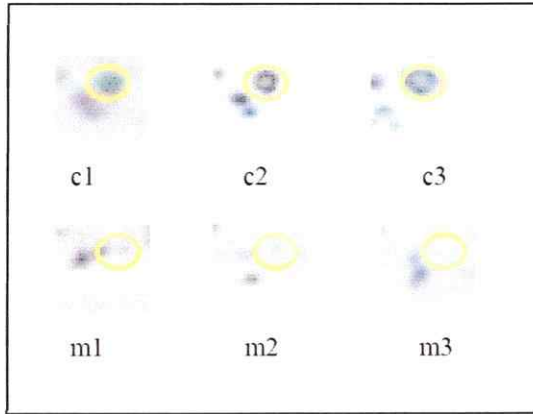
Sin embargo, en la variedad Angelus al igual que en las anteriores, también encontramos cambios significativos entre ambas condiciones, como se aprecia en la Figura 11, el spot denominado N.P.1 (Angelus Proteína 1), esta más acumulado en los frutos de cosecha, a diferencia de N.P.2, N.P.3, N.P.4 y N.P.5 que aumentan su acumulación en los frutos maduros.

Al revisar los cambios, se aprecia que el spot N.P.3, se corresponde a O.P.3, E.P.3 y J.P.3 (variedades O'Henry, Elegant lady y July Red respectivamente) y muestra el mismo perfil de acumulación en las cuatro variedades, lo que es muy interesante porque demuestra un comportamiento común que se ve influenciado en los frutos de *Prunus persica* por los estadios de cosecha y maduro. En el caso de N.P.4 y N.P.5, estas proteínas se encuentran más acumuladas en la condición madura de Angelus, y a pesar que en la misma sección de las otras variedades se ve un cambio similar durante la maduración (datos no mostrados), solo en la variedad Angelus ese cambio se presenta en todos los geles y es significativo.

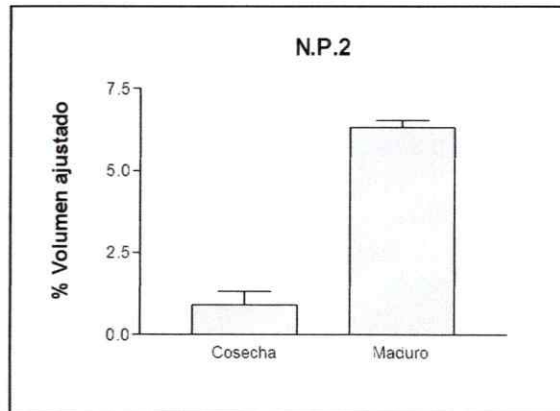
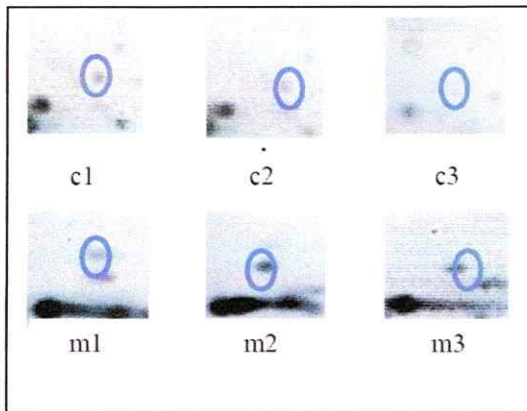
Otro caso es el de la proteína N.P.2, que corresponde a la proteína O.P.4 y que en ambas variedades esta más acumulado en la condición madura, a diferencia de las las otras dos variedades en las que no se observa en ninguna de las dos estadios de postcosecha. Finalmente, tenemos el caso de la proteína N.P.1 que se encuentra más acumulado en los frutos de cosecha y es exclusivo de Angelus



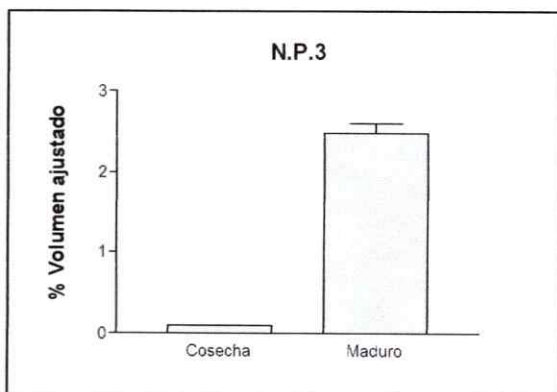
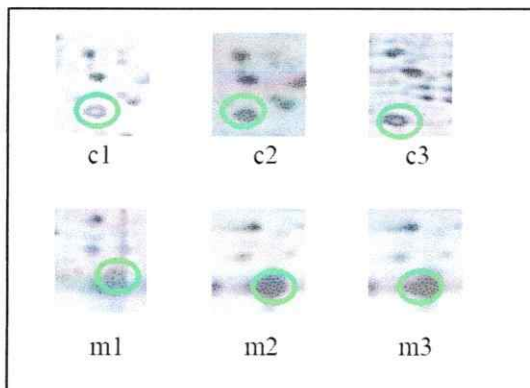
### N.P.1 (Sección B2,B3)



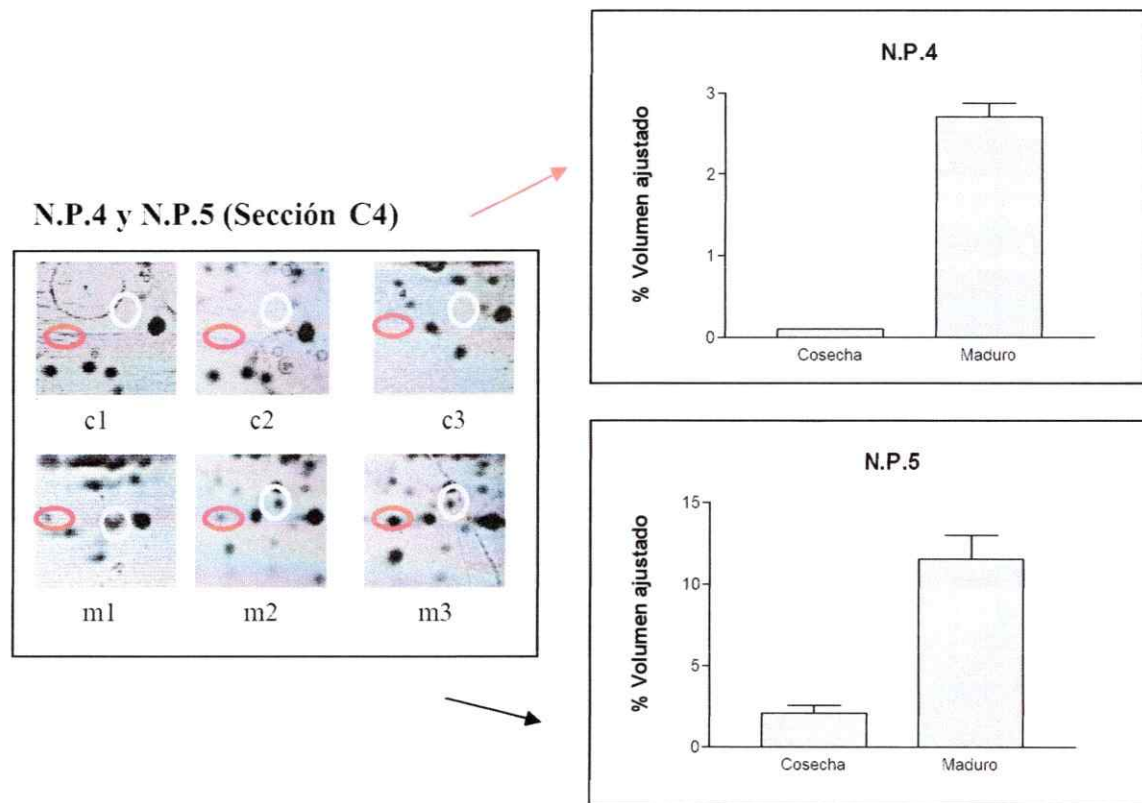
### N.P.2 (Sección A4)



### N.P.3 (Sección B2)







**Figura 11. Análisis de proteínas que cambian su grado de acumulación en las dos condiciones de postcosecha. N.P.1, N.P.2, N.P.3, N.P.4, y N.P.5.-** En los paneles que acompañan los gráficos se muestra las secciones de los tres geles realizados por condición en donde se encuentra el spot. Debajo de cada imagen se muestra la letra del gel correspondiente; c1, c2, c3 para cosecha y m1, m2, m3 para los geles de proteínas extraídas en duraznos maduros. Sobre las imágenes se coloca el nombre del spot y la sección del cuadrículado en que se encuentra, en el caso de N.P.1 corresponde a la sección B2,B3, N.P.2 la sección corresponde a A4 para N.P.3 la sección es B2 y N.P.4, N.P.5 la sección C4 del cuadrículado mostrado en la Figura 10, el gráfico de barra muestra la cuantificación del spot en dichos geles y su desviación estándar en ambas condiciones, las diferencias son significativas (t – student)

### **5.5 Análisis del proteoma de las variedades O'Henry, Elegant Lady, July Red y Angelus en la condición de cosecha. Diferencias varietales no provocadas por la maduración**

Las cuatro variedades utilizadas en este estudio demostraron tener una cantidad similar de proteínas extraíbles (300µg) a partir de la misma cantidad de tejido fresco inicial (2g). Estas proteínas al ser separadas mediante el uso de geles bidimensionales demostraron tener un patrón de distribución similar a lo largo del gradiente de pH y en cuanto a peso molecular se refiere, permitiendo realizar una comparación de los proteomas entre las distintas variedades sin considerar el factor maduración como se ha analizado anteriormente en esta tesis.

La resolución de los geles nos permite observar aproximadamente 300 proteínas en cada uno de ellos. De estas se analizaron 30, (las mostradas anteriormente en tablas) correspondientes a las proteínas de cada variedad que no cambiaban durante la maduración. Como en este caso el interés se centró en determinar si ellos presentaban algún cambio entre variedades en la condición de cosecha, fue necesario realizar un análisis del valor de porcentaje de volumen ajustado de los 12 geles (cuatro variedades y tres geles por variedad) y buscar de diferencias significativas, el test utilizado fue el de ANOVA para comparar valores promedios entre grupos.

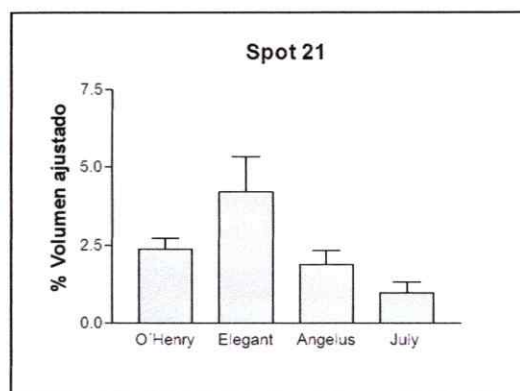
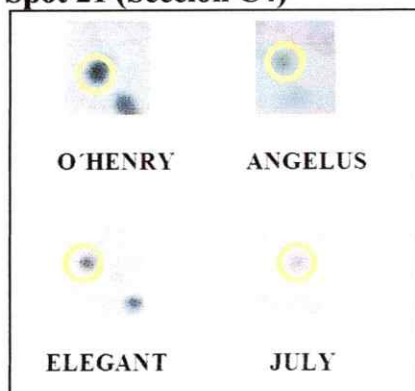
Los resultados de la cuantificación utilizando el programa *Quantity one* fueron utilizados para determinar si existen cambios significativos entre las variedades. Estos resultados se ilustran en la Tabla 6, en la cual se muestra el promedio de cada proteína cuantificada para las cuatro variedades, además se incluye la desviación estándar de cada una de ellas.

Tabla 6. Búsqueda de diferencias varietales en la condición de cosecha.- Con el fin de encontrar dentro de las 30 proteínas utilizadas para determinar el coeficiente de variación, alguna(s) que cambie(n) significativamente entre las variedades, se tomaron los valores de cada uno en los gels de cosecha y se sometieron a un test de ANOVA para encontrar diferencias significativas.

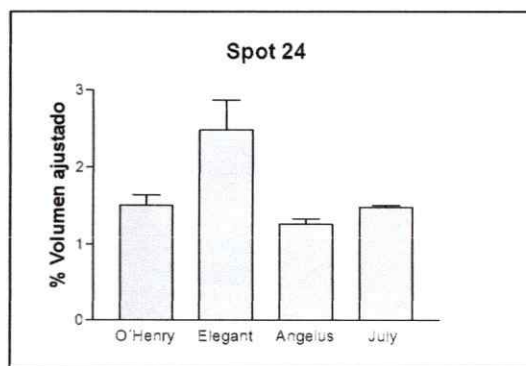
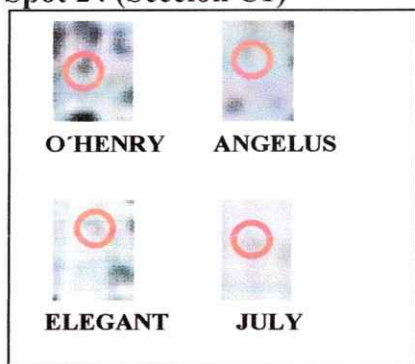
SPOT	Promedio O'Henry	Desv Est	Promedio Elegant lady	Desv Est	Promedio July Red	Desv Est	Promedio Angelus	Desv Est	F (ANOVA)
1	13,81	0,35	12,09	3,84	12,60	2,27	9,36	1,01	2,23
2	4,71	0,76	4,57	0,55	4,57	0,74	4,18	0,29	0,65
3	6,50	1,63	4,31	0,87	4,71	1,24	5,28	0,52	2,10
4	3,64	0,63	5,55	0,69	4,52	1,29	5,14	1,67	1,56
5	4,63	0,59	4,89	1,79	2,93	0,93	5,23	0,46	2,72
6	3,74	0,96	4,77	3,37	3,80	0,78	3,32	0,82	0,80
7	2,45	0,77	2,91	1,42	3,19	1,22	4,54	1,41	1,58
8	12,79	1,24	10,54	4,34	14,66	0,51	14,91	1,76	2,75
9	1,49	0,27	2,19	0,81	1,86	0,84	2,90	1,33	1,34
10	1,64	0,53	1,81	0,19	1,91	0,58	2,11	0,52	0,50
11	2,23	0,23	1,45	0,33	1,70	0,63	2,34	0,65	2,20
12	3,84	0,51	4,04	0,21	4,15	0,71	3,83	0,57	0,27
13	5,09	0,51	3,53	1,55	2,64	0,93	3,20	0,19	3,35
14	2,29	0,89	2,02	0,94	2,08	0,76	3,16	0,42	1,32
15	2,57	0,57	2,69	1,55	3,62	0,99	2,74	1,28	0,52
16	3,51	1,12	3,35	1,26	2,06	0,64	2,25	0,90	1,63
17	1,30	0,23	1,24	0,60	1,81	0,85	1,34	0,28	0,67
18	2,04	0,27	2,13	0,50	2,65	0,33	2,47	1,04	0,64
19	1,99	0,20	2,75	1,04	3,16	2,33	2,49	0,59	0,48
20	1,65	0,50	1,73	0,53	2,96	1,20	2,48	0,73	1,89
21	2,40	0,60	4,21	1,98	0,99	0,62	1,89	0,77	4,21
22	2,52	1,38	3,40	0,76	3,48	0,76	1,84	0,41	2,26
23	2,88	0,24	1,77	0,32	1,63	0,87	1,58	0,68	3,26
24	1,50	0,24	2,48	0,67	1,47	0,05	1,26	0,12	6,64
25	1,24	0,53	1,99	0,76	1,89	1,04	1,26	0,13	1,00
26	1,90	0,65	1,86	0,25	1,47	0,78	2,32	1,51	0,43
27	2,24	0,45	2,11	0,16	3,85	1,40	2,06	0,52	3,59
28	1,16	0,11	1,29	0,40	1,32	0,86	1,51	0,18	0,27
29	1,51	0,20	1,57	0,11	1,23	0,12	1,80	0,60	1,59
30	0,74	0,09	0,76	0,27	1,09	0,57	1,26	0,65	0,95

A pesar de la gran similitud en cuanto a distribución de las proteínas de las cuatro variedades estudiadas 2 de las 30 proteínas poseen un cambio significativo entre variedades (proteínas 21 y 24), en la **Figura 12** se muestra una imagen representativa de los geles en la condición de cosecha de las cuatro variedades para los spots 21 y 24, junto a un gráfico que muestra el porcentaje de volumen ajustado promedio de los tres geles realizados para las proteínas de frutos provenientes de O'Henry, Elegant lady, July Red y Angelus en la condición de cosecha.

#### Spot 21 (Sección C4)



#### Spot 24 (Sección C1)



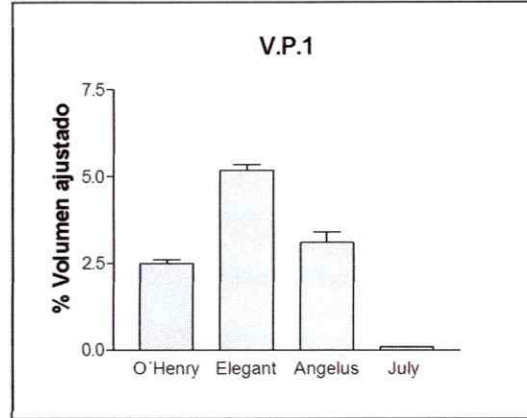
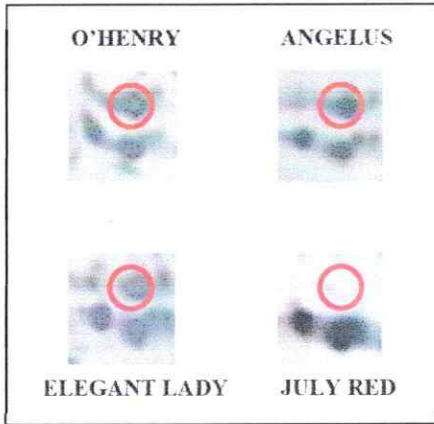
**Figura 12.- Cuantificación proteínas 21 y 24 en la condición de cosecha.-** De los 30 spots seleccionados solo el 21 y el 24 demostraron tener variaciones significativas en promedio para las cuatro variedades (test ANOVA). En la figura se muestra una imagen representativa de cada variedad, sobre ella la sección de la proteína y a la derecha el gráfico de porcentaje de volumen ajustado realizado con el valor que arrojó el programa Quantity One para dichas proteínas

Como se puede apreciar en la **Figura 12**, en el caso de la proteína 21 existe una diferencia significativa entre el valor calculado para July Red y el de Elegant lady, mientras que las otras comparaciones posibles no muestran diferencias significativas. En el caso de la proteína 24, la acumulación en la variedad Elegant Lady es significativamente superior al compararla con cada variedad, aunque entre las tres variedades restantes (O'Henry, Angelus y July Red) la diferencia no es significativa.

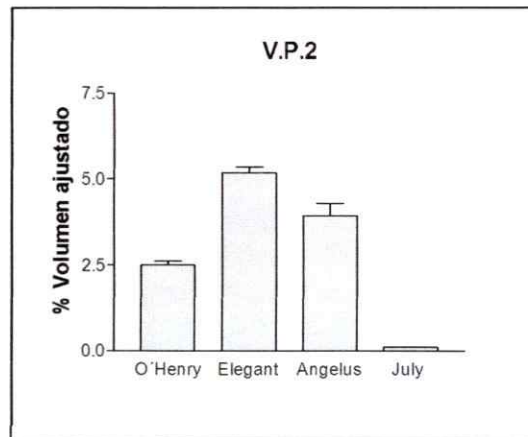
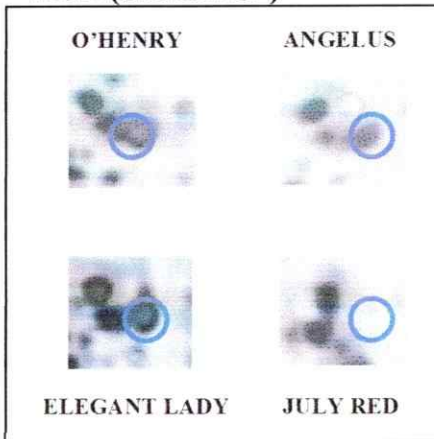
Para cuantificar las proteínas que cambian entre variedades y que no están incluidos dentro de los 30 analizados en la Tabla 6, se utilizó como normalizadores las primeras 18 proteínas presentadas en dicha tabla, elegidas por su distribución a lo largo y ancho del gel, por sus variadas intensidades y por ser proteínas que no varían significativamente entre las variedades en la condición de cosecha.

Anteriormente se mostró un análisis de las proteínas que cambian durante la maduración de las variedades y luego se analizó si los cambios entre variedades eran similares o no. En el siguiente análisis se muestran proteínas que cambian entre variedades en la condición de cosecha solamente, en busca de cambios varietales, dados por la base genética de los frutos, por ejemplo la proteína V.P.1 (Variedades Proteína 1) se encuentra presente en todas las variedades excepto en July Red (Figura 11). Sin embargo, dentro de July Red al comparar las proteínas entre los estadios cosecha y maduro, esa proteína no presenta cambios. Análogamente para las otras proteínas V.P.2 y V.P.3 mostrados en la Figura 11.

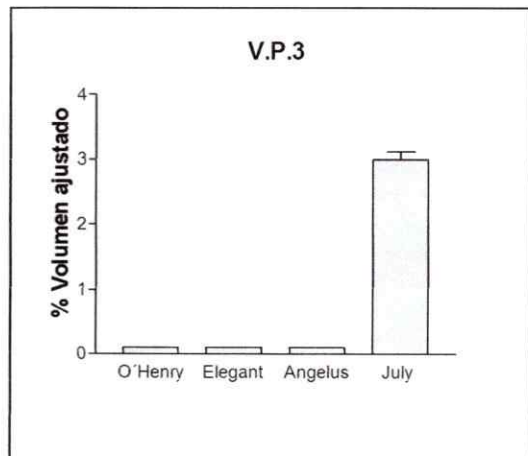
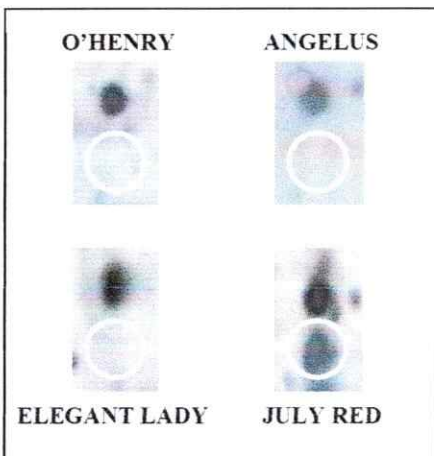
### V.P.1 (Sección B2)



### V.P.2 (Sección C2)



### V.P.3 (Sección E3)



**Figura 13. Cuantificación proteínas V.P.1, V.P.2 y V.P.3.** Además de los 30 spots se analizaron algunos con variaciones evidentes entre variedades. V.P.1 y V.P.2 presentan diferencias notorias entre las July Red y el resto de las variedades. Una situación absolutamente opuesta se observa para V.P.3. En el costado izquierdo se muestra un gel representativo de cada variedad y en el costado derecho se grafica el promedio de porcentaje de volumen ajustado de 3 geles hechos para cada variedad en la condición de cosecha.

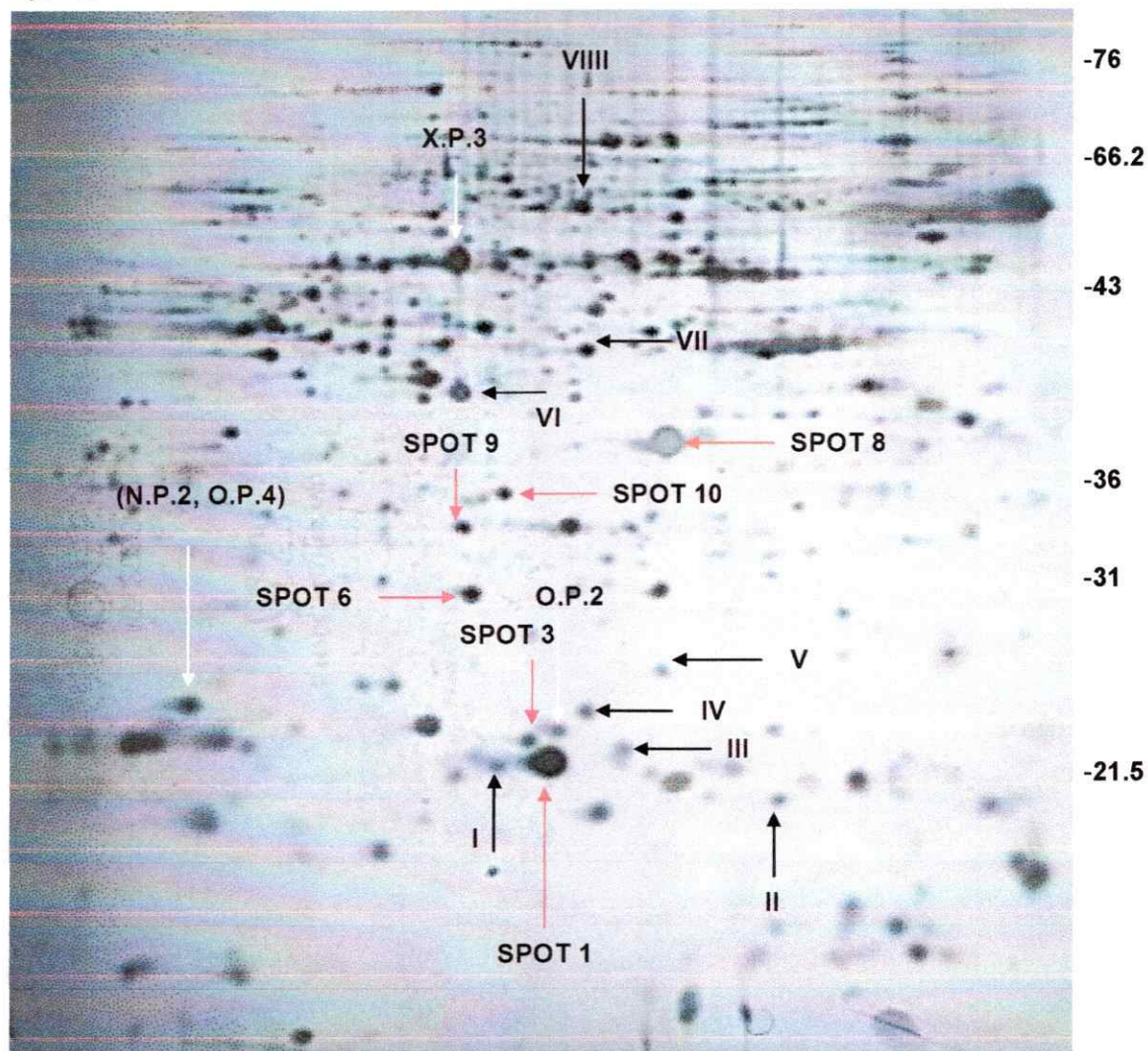
Las diferencias mostradas en la Figura 13, Indican que la proteína V.P.1 y V.P.2 se encuentran acumuladas en O'Henry, Angelus y Elegant, y ausente en el nectarín July Red. En el caso de V.P.3 se observa la proteína solamente en July Red, por tanto la diferencia es significativa con el resto de las variedades, estos cambios muestran que la similitud es mayor entre las variedades de duraznos, diferenciando al nectarin.



## 5.6 Secuenciación de proteínas.

Los resultados obtenidos hasta el momento en esta tesis, incluyen la identificación de proteínas que se mantienen constantes entre las distintas variedades, y estadios cosecha y maduro. Por otro lado, se identificaron proteínas que se acumulan diferencialmente. Proteínas pertenecientes a ambos grupos, fueron escindidas de los geles y secuenciadas por espectrometría de masa MS/MS (Figura 14). Los resultados de la secuenciación indicaron que los spots enviados no poseían contaminación con queratina o algún otro interferente y que los péptidos obtenidos no son secuencias azarosas si no que provienen efectivamente de la proteína ( $p > 99.5\%$ ). De esta forma se obtuvo secuencia de péptidos lo que permitió identificar las proteínas de las cuáles provenían. Una vez identificadas, es posible entender algunos aspectos de la funcionalidad de ellas durante la maduración de los frutos. Los resultados de la secuenciación se resumen en la Tabla 7, la información de la secuencia de los péptidos, así como la secuencia de las proteínas de la que forman parte se encuentra en el anexo I.

Algunas de las proteínas secuenciadas corresponden a las incluidas entre las 30 proteínas mostrados anteriormente que poseen un CV menor a 0.5 (denominados SPOT 1, 2, 3 etc. correspondientes a los mostrados en las tablas previas). Además, se analizaron otras proteínas que poseen un CV menor a 0.5 pero que no fueron incluidas en las tablas anteriores. Estas proteínas fueron denominadas spot I, II, III, etc, finalmente aquellas proteínas que se acumulan diferencialmente entre variedades y/o entre condición de postcosecha se indican con la sigla ocupada en los análisis anteriores, (O.P.4 por ejemplo). En el caso de la proteína que cambió entre cosecha y frutos maduros, y que apareció en cada una de las variedades analizadas se marcó en el gel como X.P.3 .



**Figura 14.- Identificación de spots secuenciados.** Gel de O'Henry en estadio maduro corrido en las mismas condiciones que los anteriores (primera dimensión de pH 3 a 10 NL, segunda dimensión 12,5% acrilamida y tinción con plata) que muestra los spots secuenciados por espectroscopia de masas, algunos de los cuales están incluidos dentro de las 30 proteínas que poseen un CV menor a 0.5 (flecha roja), además de otras proteínas con un CV menor a 0.5 no incluidas dentro de los 30 anteriores (flecha negra). Las proteínas que se acumulan diferencialmente en algún estadio o variedad aparecen indicadas con una flecha blanca

Tabla 7. Identificación de las proteínas secuenciadas.- A través de secuenciación MS/MS se obtuvieron péptidos para cada proteína indicada en la Figura 13. Con la información de los péptidos se identificaron los genes que codifican para cada proteína utilizando tBLASTn y la base de datos del proyecto genoma en nectarines ([www.genomavegetal.cj](http://www.genomavegetal.cj)), incorporando además el organismo en que se identificó y el número de acceso. Con la secuencia aminoacídica se calculó el punto isoeléctrico y peso molecular teórico (teo.) y se comparó con el experimental (exp.) obtenido mediante la ubicación en el gel.

Función		Organismo	Nº Acceso	P.M exp (kDa)	P.I exp	P.M teo (kDa)	P.I teo
SPOT 1	Alergeno Pru Av1	<i>Prunus persica</i>	gil7388028	19,6	6,6	17,6	5,8
SPOT 3	Proteína tipo heat shock	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gil81639	18,4	6,1	17,4	5,2
SPOT 6	Superóxido Dismutasa	<i>Hevea brasiliensis</i>	gil464775	25,4	6,2	25,4	7,1
SPOT 8	Proteína respuesta a stress por ácido absicico	<i>Prunus persica</i>	gil16588758	35	6,1	20,7	5,8
SPOT 9	Triosa fofato isomerasa	<i>Solanum chacoense</i>	gil38112662	33	6,2	27	5,7
SPOT 10	Subunidad alfa tipo 7 del proteasoma	<i>Cicer arietinum</i>	gil12229936	31,9	6,1	27,1	6,9
<hr/>							
N.P.2; O.P.4	Proteína tipo heat shock de bajo peso molecular	<i>Malus domestica</i>	gil6969974	20,5	8,2	18,2	5,4
X.P.3(*)	Endopoligalacturonasa	<i>Prunus persica</i>	gil3747093	50	6,9	41,2	6,24
O.P.2	Proteína tipo Glutatioón peroxidasa	<i>Nicotiana silvestri</i>	gil232190	21,1	6,8	25,9	9,2
<hr/>							
I	Alergeno Pru Av 1	<i>Prunus persica</i>	gil7388028	17,8	6,1	17,6	5,8
II	Proteína ribosomal	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gil1173201	19,9	5,3	16,4	10,6?
III	Alergeno Pru Av 1	<i>Prunus persica</i>	gil7388028	20	6,3	17,6	5,8
IV	Peroxiredoxina	<i>Populus tremoloide</i>	gil19548660	19,3	6	17,4	5,6
V	Alergeno Pru Av 1	<i>Prunus persica</i>	gil7388028	22	5,9	17,6	5,8
VI	Anexina	<i>Medicago sativa</i>	gil7441509	40,3	6,9	31,9	6,2
VII	NAD Malato Deshidrogenasa	<i>Prunus persica</i>	gil15982948	36,4	6,1	35,5	6,6
VIII	UDP Glucosa Pirofosforilasa	<i>Pyrus pirifolia</i>	gil6136112	57,5	6,5	51,6	5,9

### **Proteínas que cambian su acumulación:**

X.P.3, que es la proteína que cambió en todas las variedades al pasar de cosecha a maduro fue identificada como endopoligalacturonasa. Esta es una enzima que participa en la degradación de pectinas y que ha sido involucrada en el ablandamiento de los frutos.

N.P.2 O.P.4: Esta proteína que aumentó de cosecha a maduro en las variedades O'Henry y Ángelus fue identificada como una proteína del tipo stress térmico. Estas proteínas generalmente corresponden a chaperonas. Hasta el momento no tenemos antecedentes que indiquen que en la maduración de frutos aumente la acumulación de este tipo de proteínas. Por lo tanto este hallazgo es novedoso.

O.P.2: Esta proteína solo presentó un aumento estadísticamente significativo en la variedad O'Henry, y fue identificada como una proteína del tipo Glutación Peroxidasa. Este resultado sugiere que durante la maduración en esta variedad existiría un cambio importante en el metabolismo de óxido reducción.

### **Proteínas que no cambian:**

Alergenos: Es llamativo que una cantidad significativa de las proteínas secuenciadas (4) corresponden a alergenos. Estas proteínas aparecen de manera abundante, y la denominación de alergenos proviene de los efectos que ellas tienen en los seres humanos.

Síntesis y degradación de proteínas, chaperonas y tráfico de membranas. Proteína ribosomal, subunidades del proteosoma, proteínas de stress térmico y anexina fueron identificadas en este grupo. Estos resultados sugieren que el durazno mantiene un metabolismo basal de síntesis, plegamiento, tráfico y degradación de proteínas que no se ve fuertemente afectado por la maduración.

Metabolismo. UDP-glucosa pirofosforilasa y triosa fosfato isomerasa, son enzimas involucradas en el metabolismo de azúcares que tampoco se vieron afectadas por la maduración. NAD Malato deshidrogenasa, involucrada en el metabolismo energético tampoco se vio afectada durante la maduración.

Redox y respuesta a hormonas: Peroxidoxina, superóxido dismutasa, proteína de respuesta a stress por ácido absicico no sufrieron cambios en la maduración.

Además de ello se aprecia que en algunos casos el punto isoelectrico y peso molecular calculado a partir de la secuencia aminoacídica no coincide al obtenido a partir de la ubicación en el gel lo que se puede explicar por modificaciones post traduccionales, como por ejemplo en el caso de la proteína ribosomal. Sin embargo en muchas otras las diferencias no son demasiado drásticas y pueden deberse al error relativo que conlleva la estimación a partir del gel bidimensional. Por ejemplo, en el caso de la peroxiredoxina o la NAD dependiente Malato deshidrogenasa por nombrar algunas.

El rol que podrían estar cumpliendo estas proteínas en la maduración del fruto son abordadas en la discusión.

En el ANEXO 1 se muestran la secuencia de la proteína identificada y en rojo para cada una de ellas se muestran los péptidos obtenidos de la secuenciación a partir de los cuales se hizo la búsqueda en base de datos , entre paréntesis se muestra el organismo del cual proviene esta proteína.

## DISCUSIÓN

### **Estandarización del protocolo de extracción, tampón de resuspensión de proteínas y de las condiciones de isoelectroenfoque.**

Al trabajar en geles bidimensionales con frutos de duraznos se interponen una serie de dificultades técnicas que es importante resolver para lograr el objetivo, entre ellas se encuentra el implementar un protocolo de extracción eficiente que permita recuperar la mayor cantidad de proteínas posibles, tanto solubles como insolubles. El problema que presentan los frutos son la gran cantidad de interferentes que poseen para lograr una buena extracción y posteriormente una buena resolución de las proteínas en el gel. Entre estos compuestos los que más afectan en la extracción son las pectinas, compuestos fenólicos, terpenos, compuestos altamente ácidos y proteasas. A lo anterior se debe agregar el hecho que las células vegetales poseen pared celular, lo que hace más difícil el obtener un polvo fino a la hora de macerar el tejido. Anterior a esta tesis la literatura mostraba muy poca información que permitiera adquirir el “know how” rápidamente y uno de los logros fundamentales de este trabajo fue implementar y optimizar el procedimiento completo desde la extracción de proteínas hasta las condiciones de isoelectroenfoque óptimas, en este trabajo se pudo resolver un número aproximado de 300 proteínas de frutos, obteniendo geles de mejor calidad, en cuanto a distribución a lo largo del gradiente de pH y peso molecular, que los mostrados hasta el día de hoy en publicaciones referentes a frutos de duraznos y nectarines (Holford y col, 2002 ; Barraclough y col, 2004).

El primer paso que se optimizó fue la extracción de proteínas, durante el desarrollo de este trabajo se probaron diferentes protocolos, entre ellos algunos que involucraban extracción con Triton X -100 y ácido tricloroacético (Figura 2 A), otros protocolos que involucraban

extracción con glicerol ,  $\beta$  - mercaptoetanol y SDS (Farish et al ; Universidad de Dakota, datos no publicados) (Figura 2B) los cuales probaron ser ineficientes a la hora del rendimiento (nunca se pudo resuspender más de 50 $\mu$ g de proteína a partir de 4g de durazno) y de la limpieza de la muestra (en los geles se mostraba siempre un “rasgado” propio de muestras que están sucias con lípidos y polisacáridos) hasta que finalmente se probó con el protocolo de extracción mencionado en Materiales y Métodos en el cual se utiliza fenol. Dicho protocolo resultó ser más rápido, eficiente (a partir de 2 g de tejido se puede obtener aproximadamente 400 $\mu$ g de proteína), limpio (las precipitaciones con acetato de amonio en metanol y acetona eliminan compuestos como polisacáridos, lípidos, terpeno por nombrar algunos, que interviene con el isoelectroenfoque produciendo un resultado limpio a la hora de teñir el gel) y recupera gran cantidad de proteínas solubles aunque aun no se ha podido determinar que tan eficiente es a la hora de recuperar proteínas hidrofóbicas. Para determinarlo se hace necesario secuenciar más spots para tener un panorama más general del proteoma.

Para llegar a obtener una buena calidad de gel bidimensional se hace necesario tener las proteínas solubilizadas, denaturadas y disgregadas, para esto es necesario utilizar un buffer de resuspensión de proteínas-cuyos componentes sean capaces de lograr tal objetivo. Es así como a lo largo de este trabajo se utilizaron distintos buffer de resuspensión de proteínas y se pudo apreciar una mejora notable en el enfoque y en la cantidad de proteínas visibles en los geles cuando se cambio el tampón inicial (Urea 8M , Chaps 2%, DTT 20mM y anfolitos de pH 4 – 6.5 , 0.5%) (Holford y col, 2002) (Figura 2C) por el tampón que termino usándose para obtener todos los geles (Urea 5M, Tiourea 2M, CHAPS 2% Y SB3- 10.2%, DTT 20mM, TCEP 5mM y anfolitos 4 – 6.5 :0.5% y de pH 3 – 10 : 0.25%) (Méchin y col,

2003) (Figura 2 D), Esta mejora puede deberse a la inclusión de un agente caotropico como es la Tiourea que en combinación con la Urea se ha mostrado que mejora la solubilización de proteínas integrales de membrana y de proteínas nucleares así como también mejora la desnaturación de ellas en comparación al uso solo de Urea. Además el uso de surfactantes no iónicos como el SB3 y el CHAPS evita la formación de interacciones hidrofóbicas (Molloy y col, 2000) y al usarse en conjunto quedo demostrado que mejora la resolución de proteínas de duraznos.

Loa agentes reductores DTT y TCEP mostraron ser más efectivos en conjunto que cada uno por si solo al utilizarlos a las concentraciones adecuadas, ambos compuestos evitan la formación de puentes disulfuro y mejorar el enfoque de las proteínas. Si bien este tampón fue publicado para proteínas de plantas, en este trabajo se estandarizaron las condiciones óptimas de su uso para la resuspensión de proteínas provenientes de frutos en donde se encuentran una gran cantidad de dificultades, producto de la gran cantidad de interferentes mencionados anteriormente. Una vez resueltas las etapas de extracción, solubilización y separación de las proteínas, estas fueron teñidos con plata. Esta tinción a pesar de presentar un rango lineal acotado, da la ventaja de ser un método barato, de alta sensibilidad, fácil de realizar y es ampliamente utilizado en proteomica. (Mathesius y col, 2001). Esta tinción nos permitió visualizar un gran número de spots y como se puede observar en las imágenes de los geles, los patrones de distribución de las proteínas son altamente similares entre variedades (tal como se esperaba producto del fondo genético común de las variedades de *Prunus persica*), puesto que aproximadamente el noventa por ciento de las proteínas se encuentran presentes en las cuatro variedades y en las dos condiciones de postcosecha analizadas.



## Cambios en la acumulación de proteínas durante la maduración de los frutos de variedades de *Prunus persica*

Los científicos han estado hace mucho tiempo interesados en comprender el proceso de maduración de postcosecha de los frutos de diversas especies, siendo una de las económicamente más importante la de *Prunus persica*. El estudio de este proceso es de alta importancia porque puede entregar importante información con respecto a las propiedades fisiológicas y organolépticas del fruto que cada productor pondrá a la venta en el mercado.

Como una aproximación experimental, en este trabajo se decidió estudiar la acumulación de proteínas en dos condiciones que simulan procesos a los que se ve sometido normalmente el durazno o nectarin antes de llegar al consumidor, la primera de ellas es la etapa de cosecha en donde el fruto presenta una alta firmeza (mayor a 5 kg de presión), y otra en donde el fruto se deja madurar a temperatura ambiente hasta alcanzar una firmeza inferior a 1kg. En este trabajo nos centramos en cuatro variedades, O'Henry, Elegant Lady, July Red y Angelus, como se ha mencionado dichas variedades presentan diferencias en su aspecto, tanto en tamaño, color y textura. Por ejemplo O'Henry y July Red son de tamaño grande a diferencias de Elegant lady y Ángelus que presentan un tamaño mediano. A este tipo de diferencias se suman una serie de variaciones en las características de postcosecha analizadas (Figura 1), como son la producción de CO<sub>2</sub>, la cantidad de sólidos solubles, la producción de etileno (íntimamente relacionada con el proceso de ablandamiento).

La producción de etileno en el caso de los frutos de O'Henry y Ángelus aumentan casi tres veces durante el proceso de maduración, a diferencia de Elegant lady que aumenta aproximadamente dos veces y que permanece inalterada de July Red. A partir de estos datos era esperable encontrar cambios en proteínas que se influyen por la producción de esta hormona, como algunas involucradas en el dismantelamiento de la pared celular, la

producción de etileno, la acumulación de carotenoides, la degradación de clorofila, y la síntesis de compuestos volátiles. Los resultados muestran que se detectaron cambios y algunas de las proteínas fueron identificadas, sin embargo, el no disponer de un software de análisis impidió aumentar nuestra capacidad de análisis.

Al revisar las imágenes de los proteomas entre variedades en la condición de cosecha se identificaron proteínas presentes en una u otra, así como también se vio que el proceso de maduración desencadena en las variedades la acumulación de proteínas comunes para todas, por ejemplo la poligalacturonasa, o bien acumulación de proteínas exclusivas de una variedad, como por ejemplo la proteína tipo glutathion peroxidasa acumulada solo en la condición madura de O'Henry, y también otros casos en que se acumulaban en dos variedades, como es el caso de la proteína tipo Heat shock de bajo peso molecular que se encontró una mayor acumulación en los frutos de O'Henry y Angelus en la condición madura. En conjunto estos resultados demuestran que existen cambios tanto a nivel cualitativo como cuantitativo en la acumulación de proteínas entre las variedades de duraznos y nectarines analizadas en esta tesis.

Hasta el día de hoy, los proteomas de las variedades de duraznos y nectarines han sido poco estudiadas y existe poca información disponible sobre ellas, este trabajo representa un gran avance tanto en la aplicación de la técnica de geles bidimensionales como en su análisis. Esto permite apreciar cierta plasticidad de los proteomas de las variedades y nos da las primeras evidencias de cambios comunes y particulares en la acumulación de proteínas durante el proceso de maduración de postcosecha así como también nos entrega información sobre una gran cantidad de proteínas que permanecen inalteradas durante el proceso.

## Posible rol de las proteínas secuenciadas en el metabolismo de los frutos durante la maduración.

- **Proteínas acumuladas diferencialmente :**

Se obtuvo información que permite conocer un poco más sobre los procesos básicos que ocurren en un fruto en su período de postcosecha a través de la secuenciación de proteínas cuya acumulación no mostró cambios significativos, así como también de los procesos desencadenados en cada una de las variedades que generan cambios significativos en la acumulación de proteínas. Dentro de estas últimas, una de las proteínas que se acumuló fuertemente en la condición madura de frutos de las variedades O'Henry y Angelus fue la proteína tipo **Heat Shock** de bajo peso molecular. El análisis de los péptidos secuenciados nos revela mediante el tBlastN que la mayor homología corresponde a una HSP de manzana. En términos generales las HSP se inducen por la presencia de proteínas no plegadas o proteínas aberrantes, y se cree que juegan un rol en prevenir la agregación y que fomentan el replegamiento de otras proteínas. (Buchner y col, 1994) (Lee y col, 1995). Pero su verdadera función durante el proceso de maduración de los frutos es aún desconocida. Sin embargo, se cree que el proceso de maduración genera condiciones similares a las que produce un stress ambiental (Lawrence y col, 1997). Por ejemplo se ha visto que se inducen HSP de bajo peso molecular durante el stress osmótico, exposición a cadmio y arsenato en plantas (Almoguera y col, 1992) (Czarnecka y col 1984); también se ha visto que los transcritos de HSP se inducen durante estadios de desarrollo en tomate, así como también durante la maduración de este fruto. El aumento de esta proteína podría estar relacionada con la protección de plastidios durante el desmantelamiento de la membrana del tilacoide (que ocurre durante este proceso) probablemente gatillado por un aumento en la formación de radicales libres (Zur Nieden y col, 1995). A través de los geles bidimensionales

podemos afirmar solamente que esta proteína esta más acumulada en las variedades Angelus y O'Henry, pero probablemente en las variedades de July Red y Elegant Lady también este presente puesto que, como se ha discutido, las HSPs están presentes en frutos (tomate, duraznos, manzanas, etc.) aunque posiblemente en menor cantidad por lo que no es posible detectarla mediante geles bidimensionales teñidos con plata. Estas diferencias en la acumulación de proteínas que son capaces de reparar y volver a plegar proteínas aberrantes puede dar cuenta de una diferencia varietal que provoque cambios y diferencia en procesos de reparación a daño oxidativo por stress en el proceso de maduración. Esto podría conducir a cambios en el sabor y en otras características fisiológicas de los frutos estudiados. De hecho se ha encontrado que en la variedad de tomate *Pusa Ruby*, que se caracteriza por una gran velocidad de maduración, el gen de la HSP de bajo peso molecular se expresa de forma mas abundante en comparación con la variedad *Pusa Uphar* que tiene una baja velocidad de maduración (Anjanasree y col, 2004).

Otra de las proteína que muestra una acumulación diferencial es la proteína tipo **Glutación Peroxidasa** que se encuentra sólo en los frutos de O'Henry en la condición madura y no en ninguna de las otras variedades ni estadios. Como se ha mencionado anteriormente en la discusión, la maduración de los frutos genera una respuesta de stress oxidativo en ellos y para prevenir el daño, muchas enzimas son sintetizadas para atacar los radicales de oxígeno, es así como se ha demostrado que la enzima **Superóxido dismutasa** (también secuenciada pero sin cambios significativos entre variedades ni condición) actúa convirtiendo el ión superoxido en  $H_2O_2$  la cual es eliminada posteriormente por la ascorbato peroxidasa. Ambas enzimas existen en el cloroplasto y en el citosol. (Asada y col, 1994).

La enzima tipo glutation peroxidasa (PHGPX) al igual que la ascorbato peroxidasa cataliza la reducción de  $H_2O_2$ , además reduce hidroperóxidos orgánicos y como su nombre lo dice hidroperóxida lípidos reduciendo glutatión. Es sabido que la principal enzima en reducir el  $H_2O_2$  en plantas es la ascorbato peroxidasa (Asada 1994, Bunkelmann y col, 1996) por lo tanto es probable que la PHGPX este actuando a otro nivel u en otro organelo en la célula del vegetal. En 1997 Eshdat et al propuso un modelo para el modo de acción de ambas enzimas :

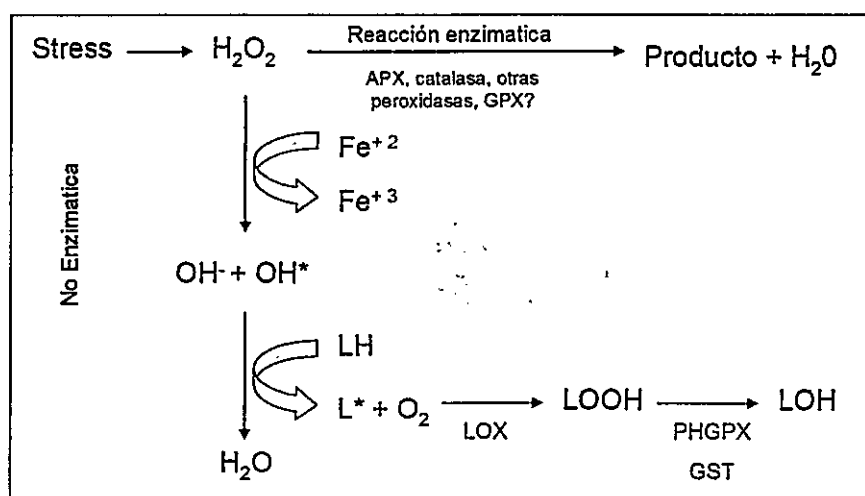


Figura 13 . Esquema propuesto para vías activadas durante el stress inducido por exceso  $H_2O_2$ .- LH ácido graso;  $L^*$  , radical de ácido graso;  $LOOH$ , hidroperóxido lípido;  $LOH$ , hidroperóxido reducido; y  $LOX$ , lipoxigenasa .

El modelo supone que durante un stress se acumula  $H_2O_2$  y la actividad de las enzimas encargadas de su eliminación es insuficiente. El exceso de  $H_2O_2$  genera una reacción de Fenton con  $Fe^{+2}$  que formaría los hidroperóxidos lípidos , actuando entonces la PHGPX . (Eshdat y col, 1997).

Como se determinó en el análisis por geles bidimensionales, la PHGPX es una de las enzimas que se expresa diferencialmente en el estado maduro de O'Henry y no en ninguna de las otras tres variedades, por esto se puede especular que esta variedad presenta un

sistema de eliminación de hidroperóxidos lipídicos que en las otras variedades puede estar disminuido confiriendo a O'Henry mayor resistencia al daño oxidativo producto de la maduración.

Otra de las proteínas interesante es la **Endopoligalacturonasa**, debido a que se observó un aumento en la acumulación en la condición de maduro respecto a cosecha en las cuatro variedades estudiadas. Como ya se ha dicho en cosecha los duraznos y nectarines poseen una firmeza superior a los 5k y en la condición madura se produce un ablandamiento del fruto hasta alcanzar una presión menor a 1k ([www.genomavegetal.cl](http://www.genomavegetal.cl)), este ablandamiento del fruto ha sido bien estudiado y se atribuye a diferentes modificaciones de la pared celular producidas por enzimas tales como la pectinametilesterasa, la expansina y otras enzimas de pared tales como la  $\beta$ -galactosidasa, la  $\alpha$ -arabinodinasa así como también de la poligalacturonasa (REF). El rol de la poligalacturonasa es despolimerizar las pectinas y su acción junto a otras enzimas es dismantelar la malla celular de glicanos, pectinas y otros azúcares que dan rigidez a la pared celular, provocando el ablandamiento observado por mediciones del penetrómetro. Sin embargo, el proceso de ablandamiento de los frutos y la actividad de sus enzimas es característico de cada especie. Es por esto que en algunos frutos, como por ejemplo el tomate, se ha visto que la actividad poligalacturonasa tiene un efecto muy tenue sobre el ablandamiento y la firmeza (Giovannoni y col., 1989; Smith y col., 1990). Al contrario, la actividad de esta enzima tiene un efecto dramático en sandía (Huber and O'Donoghue, 1993; Brummel y col., 1997) al igual que en duraznos (Crisosto y col. 2004).

Según nuestros datos de firmeza y ablandamiento, mas la información proveniente de los geles bidimensionales, podemos suponer que el ablandamiento de los frutos tiene directa

relación con la acumulación de la endopoligalacturonasa en las cuatro variedades estudiadas.

- **Proteínas acumuladas sin cambios significativos :**

Posterior a la secuenciación de algunas proteínas acumuladas diferencialmente, y como una manera de averiguar acerca del metabolismo basal de los frutos en su etapa fuera del árbol, se procedió a secuenciar algunas proteínas cuya acumulación no sufrió alteraciones entre variedades ni condición de postcosecha.. Una de ellas resultó ser **Anexina**, una proteína que se encuentra en todas las variedades y en ambos estadios, sin presentar cambios estadísticos. La secuenciación reveló que la proteína presentaba una gran homología con la anexina de alfalfa con un peso molecular aproximado de 32kDa.Las anexinas son una familia de proteínas cuya característica en común es que son capaces de unirse a las bicapas de fosfolípidos de las membranas en un proceso dependiente de calcio. Sus funciones son variadas y esenciales para los procesos celulares, dentro de las que se cuentan el tráfico entre membranas, actividad de canal de membranas, metabolismo de fosfolípidos, señalización mitótica y replicación del ADN (Roux y col 1997) .Se ha demostrado que la anexina de frutilla aumenta su expresión en el proceso de maduración cuando la frutilla pasa del estado verde al estado completamente rojo (Wilkinson y col.,1995). Se han planteado varios posibles roles para las anexinas en la maduración de frutos, estos van desde la secreción de enzimas que degradan la pared celular, hasta regulación en las propiedades de la membrana. El hecho de que no aumente su acumulación en los duraznos puede deberse a que el proceso de maduración estudiado en esta tesis considera al fruto en su etapa de postcosecha y no durante el proceso de crecimiento en el árbol, como ocurre en el caso de la frutilla.

Otra proteína que presentaba el mismo comportamiento que la anexina fue la proteína de **respuesta a stress por ácido absísico**. Las proteínas denominadas ASR (abscisic stress response) son un grupo de proteínas que comparten homologías de secuencias y las cuales se expresan en las plantas y en sus frutos bajo diversas condiciones de stress como por ejemplo frío, presión osmótica, tratamiento con ácido absísico, y el proceso de maduración de frutos (Gilad y col, 1997; Padmanabhan y col, 1997; Vaidyanathan y col, 1999), es así como en muchas especies se han encontrado genes relacionados a respuesta a ácido absísico como es el caso del arroz (Vaidyanathan y col 1999) peras (Itai y col, 2000) tomates (Amitai- Zeigerson y col 1994) y en duraznos ([www.genomavegetal.cl](http://www.genomavegetal.cl)). La posible función de estas proteínas en el proceso de maduración de frutos aún no está bien dilucidada pero recientes estudios en tomate indican que el gen *Asr1* es una proteína de unión a DNA dependiente de Zinc y que se expresa por condiciones de stress de agua y de sal en hojas y en raíces (Kalifa y col, 2004), además de frutos como el melón (Cheng y col, 2002). A pesar que la ASR de durazno es de mayor peso molecular que la de tomate o melón, sigue siendo una proteína pequeña que posee la secuencia de destinación nuclear vista para estas especies: **KKESKEEEKEAEGKKHHH** en el extremo C-terminal y no debería tener problemas para difundir pasivamente a través de los poros del núcleo pues su tamaño es de aproximadamente 21kDa (calculado a partir de la secuencia aminoácídica) el cual no es una restricción para migrar hacia el núcleo. El tamaño de esta proteína, calculado a partir de los geles bidimensionales, fue mayor al valor calculado a partir de la secuencia peptídica. La razón de esta discrepancia puede ser la presencia de modificaciones postraduccionales que pueda presentar y que aumenten su peso molecular. Una posibilidad es que la proteína sea glicosilada, ya que en la secuencia se observó que posee varios sitios donde puede sufrir una unión tipo O – GlcNAc que serían los causantes



del cambio. (<http://au.expasy.org/tools/#ptm>). Esta proteína no demostró cambios significativos en las condiciones de maduración estudiadas, así como tampoco se observó diferencias varietales estadísticamente significativas lo cual no es extraño puesto que se ha visto que el proceso de maduración de estas variedades así como también de otras especies involucra la expresión de proteínas de la familia ASR.

Otra proteína que no presenta cambios significativos es la **UDP Glucosa Pirofosforilasa**. Esta enzima está presente en todas las variedades y en las dos condiciones de postcosecha, sin presentar cambios significativos. La función de esta pirofosforilasa en tejidos de frutos en maduración es transformar la UDP-Glu en Glu-1-P para la entrada de energía en el metabolismo. Además la enzima juega un rol importante en generar UDP glucosa a partir de hexosas fosfatadas y la UDP glucosa a su vez es un importante punto de partida para la síntesis pared celular y polímeros como precursor de numerosos nucleosidos azucares difosfato necesarios para ese complejo de polímeros (Studer Feusi y col 1999).

También encontramos mediante secuenciación la enzima **NAD Malato deshidrogenasa**. Esta enzima es parte de la maquinaria del ciclo de los ácidos cítrico y málico (convierte el malato en oxaloacetato en una reacción dependiente de NAD) y participa en su síntesis y degradación, ambos ácidos son los que determinan que una variedad de duraznos sea considerada como "normal ácida", "poco ácida" o "muy ácida". Sin embargo, se ha mostrado que en duraznos la expresión del gen de la malato deshidrogenasa no es fruto específica y no difiere significativamente entre una especie poco ácida y una normal ácida a diferencia de otros procesos celulares bien estudiados de desarrollo del fruto como son la degradación de pared celular y la síntesis de etileno que si presentan la expresión de genes altamente específicos. (Rothan y col, 2002), por tanto se cree que esta enzima no sería clave para la acidez del fruto. Nuestros resultados de geles bidimensionales muestran que esta

proteína no cambia en las cuatro variedades a pesar que ellas poseen diferente grados de acidez. Este resultado sugiere por lo tanto que esta proteína no participaría en determinar la acidez de un durazno.

Otra de las proteínas que no presentó cambios estadísticamente significativos fue la **Triosa Fosfato Isomerasa**. Esta enzima participa en la glucólisis y en la gluconeogénesis, catalizando la interconversión entre gliceraldehído – 3 fosfato y la dihidroxiacetona fosfato.

Como se observa en los Resultados muchos de los spots secuenciados corresponden a alérgenos (estructurales de pared celular). Estas proteínas aparecen de forma abundante en las distintas variedades, sin embargo, la función que ellos cumplen no es clara. Una de las hipótesis que se ha planteado es que estas proteínas juegan un papel en la estabilización de la estructura de la pared celular durante el proceso de ablandamientos en frutos (Traittoni y col , 2003). Sin embargo, en esta tesis no se encontraron diferencias significativas en la acumulación de este tipo de proteínas, a pesar que en la literatura existen reportes de que en algunas variedades de *Prunus persica*, existen muchos alérgenos que si presentan cambios entre variedades (Brenna y col, 2004).

## CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

Como parte final de este trabajo se pueden sacar conclusiones importantes que se resumen a continuación :

- 1.- El método de extracción con fenol demostró ser por rendimiento el mejor método para extraer proteínas desde el fruto de durazno.( 400 $\mu$ g a partir de 2g de tejido).
- 2.- Las condiciones necesarias de isoelectroenfoque son variadas y necesitan ser determinadas experimentalmente para cada sistema particular puesto que se probaron distintos tiempos de corrida para la primera dimensión (resultados no mostrados) observando la mejor calidad de spots en cuanto a enfoque, reducción de stricking (lineas sobre el gel) y número de spots en el gel.
- 3.-A través de este método es posible detectar tanto cambios cualitativos como cuantitativos en las condiciones estudiadas, evidenciando que durante el proceso de maduración de duraznos y nectarines no se acumulan necesariamente las mismas proteínas y aun más estos cambios pueden dar cuenta de diferencias varietales que expliquen las distintas respuestas a la maduración y a cualidades organolépticas.
- 4.- Gran parte de las proteínas que se muestran son compartidas tanto entre variedades como en las dos condiciones de postcosecha, sin cambios significativos en la acumulación.
- 5.- De las proteínas secuenciadas se muestran muchas que están presentes en todas las variedades y que tiene relación a la respuesta a daño oxidativo en las células., ejemplos como la superóxido dismutasa y la peroxiredoxina permite ver comportamientos similares aunque también se puede observar diferencias en otras proteínas del sistema de protección como es la glutatión peroxidasa presente sólo en O'Henry

Los resultados de este trabajo tienen el potencial de seguir extendiéndose, mediante el análisis de las imágenes con un software indicado que permita cuantificar cada uno de los spots y permita determinar diferencias cuantitativas entre variedades o en el proceso de maduración. Posteriormente se pueden secuenciar más proteínas y gracias al desarrollo del proyecto genoma de nectarines se pueden corroborar los datos con los perfiles de expresión digital generados a partir de genotecas de cDNA así como también mediante el uso de macroarreglos. Toda esta información en su conjunto permitiría identificar marcadores moleculares candidatos a estar involucrados en los cambios que sufre el fruto durante su tratamiento de postcosecha. De esta forma sería también posible generar una base que permita identificar cualidades favorables de cada variedad con el fin de buscar mediante mejoramiento genético nuevas variedades. Alternativamente, el uso de la información puede ser utilizado para seleccionar caracteres favorable y generar plantas transgenicas cuyos frutos sean apreciados por el mercado.

## REFERENCIAS

- Alexander L, Grierson D (2002).** Ethylene biosynthesis and actin in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* 53, 2039 – 2055.
- Almoguera C, Jordano J (1992).** Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry – seed – stored low molecular weight heat shock protein and Lea mRNAs. *Plant Molecular Biology* 19: 781-792
- Amitai – Zeigerson ,H ., Scolnik ,P. And Bar zvi D, (1995).** Genomic nucleotide sequence of a tomato *Asr2*, a second member of the stress/ripening – induced *Asr1* gene family. *Plant Physiology*. 106, 1699 – 1700.
- Anderson, L and Seilhamer, J. (1997).** A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 18: 533 – 537
- Anderson, L and Anderson, G (1998).** Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19 : 1853 - 1861
- Anjanasree K, Srivastava A, Handa A, Bansal K. (2005).** Identification of differentially expressed ripening related cDNA clones from tomato (*Lycopersicon esculentum*) using tomato EST array. *Current Science* 5, 792.– 796.
- Asada ,K (1994).** Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. *CRC Press, Boca Raton, FL* 77- 104.
- Ayub R, Guis M, Ben Amor M, Gillot L, Roustan JP, Latche A, Bouzayen M, Pech JC.(1996).** Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nat Biotechnol*. Jul;14(7):862-6.
- Bahrman N, Le Gouis J, Negroni L, Amilhat L, Leroy P (2004).** Differential protein expression assessed by two dimensional gel electrophoresis for two wheat varieties grown at four nitrogen levels. *Proteomics* 4, 709 – 719.
- Barracough D, Obenland D, Laing W, Carroll T (2004).** A general method for two dimensional protein electrophoresis of fruit samples. *Postharvest Biology and technology* 32, 175 - 181
- Bonghi C, Ferrarese L, Ruperti B, Tonutti P, Ramina A (1998).** Endo- $\beta$ -1,4- glucanases are involved in peach fruit growth and ripening, and regulated by ethylene. *Physiologia Plantarum* 102, 346 – 352
- Bradford, M.M.(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.

- Brenna O, Pastorello E, Farioli L, Pravettoni V, Pompei C (2004).** Presence of Allergenic Proteins in Different Peach (*Prunus persica*) Cultivars and Dependence of Their Content on Fruit Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 7997 – 8000.
- Brummel D, Dal Cin V, Crisosto C, Labavitch J, (2004).** Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany*. **405** : 2029 – 2039
- Brummel DA, Labavitch JM. (1997).** Effect of antisense suppression of endopoligalacturonase activity on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and in fruit homogenates. *Plant Physiology* **115**, 717 – 725.
- Buchner J, Jakob U.(1994)** Assisting spontaneity : The role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biocemestry* **19**: 205- 211
- Bunkelmann JR, Trelease RN. (1996).** Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiology* Feb;110(2):589-98.
- Casar JC, Mckenhie B, Fallon J, Young M, Brandan E (2004).** Transient up-regulation of biglycan during skeletal muscle regeneration:delayed fiber growth along with decorin increase in biglycan-deficient mice. *Developmental Biology* **268**, 354 - 361 .
- Chevalier F, Martin O, Rofidal V, Devauchelle A, Barteau S, Sommerer N, Rossignol M (2004).** Proteomic investigation of natural variation between *Arabidopsis* ecotypes. *Proteomics* **4** , 1372 – 1381.
- Cloe L, Lee K, (2003).** Quantitative and qualitative measure of intralaboratory two dimensional protein gel reproducibility and the effects of sample preparation, sample load, and image analysis. *Electrophoresis* **24** , 3500- 3507
- Coupe SA, Deikman J. (1997).** Characterization of a DNA-binding protein that interacts with 5' flanking regions of two fruit-ripening genes. *Plant Journal* Jun;11(6):1207-18.
- Crisosto, C., Mitchell, G. and Ju, Z. (1999).**Susceptibility to chilling injury of peach, nectarine, and plum cultivars grown in California. *Hort. Science* **34**: 1116 – 1118.
- Czarnecka E, Edelman L, Schoff F, Key JL. (1984).** Comparative analysis of physical stress responses in soybean seedling using cloned heat shock cDNAs. *Plant Molecular Biology* **3**: 45 - 58
- Dominguez – Puigjaner E, Vendrell M, Ludevid MD (1992).** Differential protein acumulation in banana fruit during ripening, *Plant Physiology* **98** : 157 - 162
- Eshdat Y. Holland D, Zahava F, Hayyim G (1997).** Plant glutathiones peroxidases. *Physiologia Plantarum* **100**: 234 – 240.

- Etienne C, Moing A, Dirlewanger E, Raymond P, Monet R, Rothan C (2002).** Isolation and characterization of six peach cDNAs encoding key proteins in organic acid metabolism and solute accumulation: involvement in regulating peach fruit acidity. *Physiologia Plantarum* 114 : 259 – 270 .
- Gygi, S., Rochon, Y.,Franza, B and Aebersold, R (1999).** Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol.Cell.Biol.* 19: 1720 – 1730.
- Giovanonni JJ, DellaPenna D, Bennett AB, Fisher RL (1989).**Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic *rin* (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *The Plant Cell* 1 , 53 – 63.
- Giovanonni J (2001) .** Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* . 52 : 725 – 749
- Giovanonni J (2004).** Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *The Plant Cell* 16, 170 - 180
- Holford P, Abdi N, McGlasson B (2002).** Application of two dimensional gel electrophoresis to detect proteins associated with harvest maturity in stone fruit. *Postharvest Biology and technology.* 26, 1 - 13
- Huber DJ, O'Donoghue EM. (1993).** Polyuronides in Avocado (*Persea americana*) and Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Fruits Exhibit Markedly Different Patterns of Molecular Weight Downshifts during Ripening. *Plant Physiology.* Jun;102(2):473-480.
- Itai A, Tanabe K, Tamura F, Tanaka T.(2000).** Isolation of cDNA clones corresponding to genes expressed during fruit ripening in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai): involvement of the ethylene signal transduction pathway in their expression. *J Exp Bot.* Jun;51(347):1163-6.
- Kalifa Y, Gilad A, Konrad Z, Zaccari M, Scolnik P, Bar Zvi D (2004).** The water and salt stress regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc dependent DNA binding protein. *Journal Biochemistry* 381, 373- 378.
- Lawrance S, Cline K, Moore G, (1997).**Chromoplast development in ripening tomato fruit: identification of cDNAs for chromoplast – targeted proteins and characterization of a cDNA encoding a plastid – localized low molecular weight heat shock protein. *Plant Molecular Biology* 33: 483 – 492 .
- Lee GJ, Pokala N, Vierling E (1995):** Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock protein from pea. *J Biol Chem* 270 : 10432- 10438.
- Lester D, Speirs J, Orr G, Brady C, (1994).** Peach (*Prunus persica*) Endopolygalacturonase cDNA Isolation and mRNA Analysis in Melting and Nonmelting Peach Cultivars. *Plant Physiology* 105, 225-231

**Mathesius U, Keijzers G, Natera SH, Weinman JJ, Djordjevic MA, Rolfe BG. (2001).** Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics*. Nov;1(11):1424-40.

**Mechin V, Consoli L, Le Guilloux M, Damerval C. (2003).** An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *Proteomics* 23, 1299 – 1302

**Medina Suarez M, Manning K, Fletcher J, Aked J, Colin B, Seymour G.B (1997) .** Gene Expression in the Pulp of Ripening Banana. *Plant Physiology* 115: 453 – 461 .

**Molloy MP, Brzezinski EE, Hang J, McDowell MT, VanBogelen RA.(2003).** Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. *Proteomics*. Oct;3(10):1912-9.

**Kalifa Y, Gilad A, Konrad Z, Zaccari M, Scolnik P, Bar Zvi D (2004).** The water and salt stress regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc dependent DNA binding protein. *Journal Biochemistry* 381, 373- 378.

**Lawrance S, Cline K, Moore G, (1997).**Chromoplast development in ripening tomato fruit: identification of cDNAs for chromoplast – targeted proteins and characterization of a cDNA encoding a plastid – localized low molecular weight heat shock protein. *Plant Molecular Biology* 33: 483 – 492 .

**Lee GJ, Pokala N, Vierling E (1995):** Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock protein from pea. *J Biol Chem* 270 : 10432- 10438.

**Lester D, Speirs J, Orr G, Brady C, (1994).** Peach (*Prunus persica*) Endopolygalacturonase cDNA Isolation and mRNA Analysis in Melting and Nonmelting Peach Cultivars. *Plant Physiology* 105, 225-231

**Mechin V, Consoli L, Le Guilloux M, Damerval C. (2003).** An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *Proteomics* 23, 1299 – 1302.

**Molloy M, (2000).** Two dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH Gradients. *Analytical Biochemistry* 280 , 1- 10

**Molloy M, Brzezinski E, Hang J, (2003).** Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics . *Proteomics* 3 1912 – 1919

**Oeller PW, Lu MW, Taylor LP, Pike DA, Theologis A, (1991).** Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science*. Oct 18;254(5030):437-9.



**Padmanabhan V, Dias D, 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.

**Phillips L, Barry C, Giovannoni J (2004).** Signal Transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science* **9**, 331 – 338

**Picton S, Gray J, Barton S, AbuBakar U, Lowe A, Grierson D.(1993).** cDNA cloning and characterisation of novel ripening-related mRNAs with altered patterns of accumulation in the ripening inhibitor (*rin*) tomato ripening mutant. *Plant Mol Biol.* Oct;23(1):193-207.

**Radzikowski L, Nestic L, Boskov Hansen H, Jacobsen S, Sondergaard I (2002).** Comparison of ethanol – soluble proteins from different rye (*Secale cereale*) varieties by two – dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **23**, 4157 - 4166

**Roux S, Greg B, (1995).** Annexins of Plant Cells. *Plant Physiology* **109** : 1133-1139

**Smith DL, Watson CF, Morris PC ,(1990).** Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Molecular Biology* **14**, 369-379.

**Studer Feusi M, Burton J, Williamson J, Pharr M. (1999).** Galactosyl sucrose metabolism and UDP – galactose pyrophosphorylase from *Cucumis melo* L. Fruit. *Physiologia Plantarum* **106**: 9 – 16

**Theologis A, Oeller PW, Wong LM, Rottmann WH, Gantz DM, (1993).** Use of a tomato mutant constructed with reverse genetics to study fruit ripening, a complex developmental process. *Dev Genet.* **14**(4):282-95

**Trainotti L, Zanin D, Casadoro G (2003).** A cell wall oriented genomic approach reveals a new and unexpected complexity of softening in peaches. *Journal of Experimental Botany* **54**, 1821 - 1832

**Vaidyanathan R, Kuruvilla S, Thomas G (1999).** Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. *Plant Science* **140**: 21 – 30.

**Von Mollendorf, L. (1987).** Wooliness in peaches and nectarines: a review. I. Maturity and external factors. *Hort. Science* **5**: 1 – 3.

**Wilkinson J, Lanahan M, Conner T, Klee H, (1995).** Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. *Plant Molecular Biology* **27**: 1097- 1108.

Yan X., Robin Wait , Tom Berkelman , Rachel A. Harry , Jules A. Westbrook , Colin H. Wheeler , Michael J. Dunn . (2000). A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization- mass spectrometry. *Electrophoresis* 21 : 3666 – 3672.

Yoneda Y. (2000). Nucleoplasmic protein traffic and its significance to cell function. *Genes Cells* 5, 777 – 787.

Zur Nieden U, Neumann D, Bucka A, Nover L. (1995). Tissue specific localization of heat stress protein during embryo development. *Planta* 196 : 530 – 538.

## ANEXO I

### SPOT 1, I, III, V.- Major Allergen Pru Av 1 (*Prunus persica*)

MGVFTYESEFTSEI PPPRLFKAFVLDADNLVPKIAPQAIKHSEILEGDDGGPGTIKKITTFGEGSQYGYVHK  
KIDSIDKENYSYSYTLIEGDALGDTLEKISYETKLVASPSGGSI IKSTSHYHTKGNVEIKEEHVKAGKEK  
ASNLFKLIETYLKGHDPDAYN

### SPOT 3 Heat shock protein 17 (*Arabidopsis thaliana*)

MSLVPSFFGGRRTNVFDPFSLDVWDPFEGFLTPGLTNAPAKDVAAFTNAKVDWRETPEAHVFKADVPGLK  
KEEVKVEVEDGNILQISGERSSENEKSDTWHRVERSSGKFMRRFRLPENAKVEEVKASMENGVLSVTVF  
KVQESKPEVKSIDISG

### SPOT 6 Super oxido dismutasa (Mn). (*Hevea brasiliensis*)

MALRSLVTRKNLPSAFKAATGLGQLRGLQTFSLPDLPHYDYGALEPAISGEIMQLHHQKHHQTYITNYNKA  
LEQLNDAIEKGDAAVVKLQSAIKFNGGGHVNSIFWKNLAPVREGGELPHGSLGWAIADDFGSLEKLI  
QLMNAEGAALQSGWVWLALDKELKKLVVETTANQDPLVTKGPTLVPLLGIDVWEHAYYLQYKNVRPDYL  
KNIWKVMNWKYASEVYAKECPSS

### SPOT 8 Proteína de respuesta a stress por ácido absicico (*Prunus persica*)

MSEKHHHGLFHHHKDEDRPIETSDYPPQSGGYSDEGRGTSGSYGGGGGYDGGGGGYDNTAYSSEGRPGSG  
YGGGGYGESADYSDGGRYKETAAYGTTGTHESEIDYKKEEKHHKLEHLSEAGAAAAGVFALHEKHESK  
KDPEHAHRHKIEEEIAAAAAGVSGGFAPHEHHEKKEAKEEEEEESHGKHHHHLF

### SPOT 9 Triosa fosfato isomerasa, forma citosolica (*Solanum chacoense*)

MGRTEFFVGGNWKNGTSEEIKKIVATLNAGQVPSQDVVEVVVSPPYVFLPLVKNELRSDFHVAAQNCWVK  
KGAFTGEVSADMLVNLGIPWVILGHSERRAILGESNEFVGDKVAYALSQGLRVIACVGETLEQRESGST  
MDVVAQTKAIAERVKDWSNVVAYEPVWAI GTGKVATPAQAQEVHAELRKWLQANVSAEVAASTRI IYG  
GSVSGANCKELAGQPDVDGFLVGGASLKPEFIDI IKA AEVKKGA

### SPOT 10 Subunidad del proteasoma alfa tipo 7 (*Cicer arietinum*)

MARYDRAITVFS PDGHLFQVEYALEAVRKGNAAVGVRGTDNVVLGVEKKSTAKLQDTRS VRKIVNLDHDI  
ALACAGLKADARVLINRARVECQSHRLTVEDPVTVEYITRYIAGLQKQYTSQSGVRPFGLSTLIVGFDPI  
TGSPSLYQTDPSGTFSAWKANATGRNSNSIREFLEKNFKETSGQETVKLAIRALLEVVESGGKNIEVAVM  
TKENGLRQLEAEIDAIVAEIEAEKAAAEAAKAPPKDT

### N.P.2, O.P.4.- Proteína de tipo Heat shock de bajo peso molecular (*Malus x Domestica*)

MSLIPNSRRGSSSVFDPFSLNLWDPFKDFPFPSSSSLSAFPEFSRENSAFVNTRVDWKETPEAHVFKADV  
PGLKKEEVKVEVEDDRVLKISGERNVEEDKNDKWYRVERSSGKFLRRFQLPENAKVDQIKAAENGVLS  
VTVPK AELKNVDVRAIEISG

### X.P.3 Endopoligalacturonasa (*Prunus persica*)

MANRRSLFSLSLI FVFMINSALATPVTYNVASLGAKADGKTDSTKAFLSAWAKACASMNPGVIYVPAGTF  
FLR~~OVV~~FSGPCKNNAITFRIAGTLVAPSDYRVIGNAANWIFFHHVNGVTISGGILDGQGTALWACKASHG  
ESCPGATTLGFSDSNNIVVSGLASLNSQMFHIVINDCQNVQM~~QGV~~VSASGNSPNTDGIHVQMSSGVTI  
LNSKIATGD~~DCVS~~IGPGTSLNWIEGVACGPGHGISIGSLGKEQEEAGVQNVTVKTVTFTGTQNGLRKISW  
GRPSTGFARNILFQHATMVNVENPIVIDQHYCPDNK~~GCPGQVSGVQISDVTYEDIHGT~~SATEVAVKFD~~CS~~  
PKHPCSEIKLEDVKLTYKNQAAESSCSHADGTTTEGVVQPTSC~~L~~

### O.P.2 Proteína tipo Glutation peroxidasa (*Nicotiana silvetris*)

MASQSSK~~PQ~~SIYDFTVKDAKGNVDVLSIYKGVLIIVNVASQCGLTNSNYTDLTEIYK~~YK~~DQGLEILAF  
PCNQFGGQEPGSIEEIQNMVCTRFX~~AEYPI~~FDKVDVNGDNA~~APLYK~~FLKSSKGGFFGDSIKWNFSKFLVD  
KEGNVDRYSPTTTPASMEKDIKLLGVA

### II.- Proteína Ribosomal 40s

MAPKKAAGDEAPKEVVS LGPTVREGEHVFVGAHI FASFN~~DT~~FVHVTDLSGRETISRVTGGMKVKADRDE  
SSPYAAM~~LAAQ~~DVAQKCKELGITALHIKLRATGGNRTKTPGPGAQSALRALARAGMKIGRIEDVTPIPTD  
STRKGGRRGRRL

### IV.- Peroxiredoxina (*Populus tremuloide*)

MAPIAVGDVLPDGKLAYFDEQDQLQEVSVHSLVAGKKVILFGVPGAFTPTCSLKHVPGFTIEKAGELKSKG  
VTEILCISVNDPFVMKAWAKSYPENKHVKFLADGSATYTHALGLELDLQEKGLGTRSR~~R~~FALLVDDLKVK  
AANIEGGGEFTVSSAEDILKDL

### VI.- Anexina (*Medicago sativa*)

SHVPSPE~~SE~~QLRGA~~FQ~~GWGTNEGLIISILAHRNAAQRKSIRETYTQTHGEDLLKDLDELSSDFEKAV  
LLW~~TLD~~PAE~~R~~DAFLANQATKMLT~~SNNS~~IIVEIASTRSPELELLKAKQAYQVRFKK~~SLEED~~VAYHTSGDIRK  
LLVPLVGIHRYEGDEVNMTLAKSEAKLLHEKIADKAYNHDDLIRIVTTRSKAQLNATLNHYNNEFGNVID  
KDLETDS~~DE~~EYLLKLLRAAIKGLTYPEKYFEELLRLAINKMGTDENALTRVVTTRA~~EVD~~LQRIAE~~EY~~QRRN  
SVPLDRAIDKDTSGDYQKILLALMGHDE

### VII.- Malato deshidrogenasa dependiente de NAD (*Prunus persica*)

MAKGPVRV~~LVT~~GAA~~GQ~~IGYALVPMIARGVMLGADQPVILHLLDIPPAEALNGVKMELVDAAPPLKGVV  
ATTDVVEACTGVNIAVMVGGFPRKEGMERKDVMSKNVSIYKSQASALEKHAAAANCKV~~LVVAN~~PANTNALI  
LKEFAPSIPEKNITCLTRL~~DHNR~~ALGQVSERLNVQVSDVKNV~~I~~IWGNHSSSQYPDVNHATVKT~~PS~~GEKAV  
REL~~VADDA~~WALTGEFTTVQQRGA~~AI~~I KARKLSRALSAASSACDHIRDWVLGTPEGTWVSMGVYSDGSYNV  
PSGLIYSFPVTCQNGEWK~~IVQGLS~~IDEFSR~~KL~~DATADELSEEKALAYSCLS

### VIII.- UTP Glucosa pirofosforilasa (*Pyrus pirifolia*)

MAAVATGNVDKLS~~DVA~~SLSQISENEKNGFINLVSRYVSGEEAQHVEWSKIQTPTDEVVVPYDGLAPTPE  
DPEEIKKLLDKLVVLK~~LN~~GGLGTTMGCTGPKSVIEVRNGLTFLDLIVIQIENLNNKYGSCVPLLLMNSFN  
THDDTQKIVEKYSK~~SNV~~QIHTFNQSQY~~PR~~LVVEDFSPLPSKGQTK~~DG~~WYPPGHGDVFP~~SL~~KN~~NSG~~LDLL  
LSQ~~G~~KEYVFIANS~~DN~~LGA~~VVD~~LKILHHLIQK~~KN~~EY~~CME~~VTPKTLADVKG~~GT~~LISYEGRVQ~~LE~~IAQVPDQ  
HVNEFKSIEKFKIFNTNNLWVNLNAIKR~~LVE~~ADALKMEIIPNPK~~E~~V~~DG~~VKVLQLETAAGAA~~TR~~FFNHAIG  
INVPRSRFLPVKATSDLLLVQSDLYTLQDGFVTRNSARKN~~NPEN~~PTIELGPEFKKVG~~SY~~LSR~~FKS~~IPSILE  
LES~~LK~~VSGDVWFGAGVVLK~~GK~~V~~TI~~TAKSGVKLEIPD~~NAVI~~ANKDINGPEDL

## ANEXO II

Tabla resumen de cambios fisiológicos durante el paso de cosecha a maduro de las 4 variedades

	Etileno cosecha (ul/kh)	Etileno maduro (ul/kh)	% CO <sub>2</sub> Cosecha (ml/kh)	% CO <sub>2</sub> Maduro (ml/kh)	Sólidos solubles (°Brix) cosecha	Sólido solubles (°Brix) maduro	% p/p Acidez en cosecha	% p/p Acidez maduro	Días para ablandamiento
<b>O'Henry</b>	1.6	4.37	28.76	157.49	10.72	10.60	0.88	0.75	6
<b>Elegant lady</b>	0.79	1.32	3.95	58.22	8.98	8.98	0.65	0.63	7
<b>Angelus</b>	0.89	2.49	8.75	71.15	11.78	12.55	0.95	0.88	6
<b>July Red</b>	1.59	1.59	63.48	63.48	11.32	12.09	0.83	0.76	3