

UCH-FC
Biotecnología
6643 X
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

Expresión y actividad/ acumulación de Poligalacturonasa, Pectina
Metilesterasa y Expansina en frutos de *Prunus persica*
almacenados en frío.

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular



Por

Susana Manón González Fernández-Niño

Agosto, 2005
Santiago-Chile

Director de Memoria de Título: Dr. Ariel Orellana López



“Expresión y actividad/ acumulación de Poligalacturonasa, Pectina Metilesterasa y Expansina en frutos de *Prunus persica* almacenados en frío.”

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

SUSANA MANÓN GONZÁLEZ FERNÁNDEZ-NIÑO

Dr. Ariel Orellana López
Director de Memoria de Título

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Liliana Cardemil
Presidente Comisión

Dr. Victoria Guixé
Profesor corrector

Santiago de Chile, 24 de Agosto, 2005





Susana Manón González Fernández-Niño, nombre y apellido que complicaron más de una vez al personal administrativo de la Universidad de Chile. Nacida en Santiago el 20 de Enero de 1977 y malcriada en Arica desde los 6 años, pero la tierra natal volvió a llamar con el pretexto de una carrera nueva que comenzaba a imponerse en Chile; Ing. Biotecnología Molecular, uff!!!! Eso complico a los familiares y amigos, que hasta el día de hoy no tienen muy claro el nombre completo de la carrera, irreplicable para algunos... Feliz de haber pasado por la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, desde donde hoy existen los mejores amigos, los grandes amores y el recuerdo de las grandes "jaquecas" y experiencias de vida.

Nostalgia en este momento de culminación, agradecida de todos los que siempre me apoyaron (Papas les debo una grande!!!) y ansias de enfrentar los nuevos desafíos.

Suerte Ushi!!!!!!

AGRADECIMIENTOS



Quisiera agradecer a mis padres; Magda y Eddie y hermanos; Rodrigo, Valeska, Gabriel y Diego, por creer en mi y darme el incansable apoyo que siempre tuve, aunque fuera a la distancia.

Al Dr. Ariel Orellana, le agradezco por haberme guiado desde que llegue al Lab. de Estructura y Función de Membranas Biológicas (Memlab), pasando por el Lab. de Genética Molecular Vegetal, y en el presente, en el Centro de Biotecnología Vegetal, agradezco su guía en esta tesis, sus críticas y discusiones, también por haber depositado su confianza desde el principio en la realización de este proyecto.

Al Dr. Luis Luchsinger, por su gran amistad, su guía y paciencia para explicarme el mundo "macro" de la ciencia, y los grandes aportes a esta tesis. Por las discusiones enriquecedoras, mientras cosechábamos (comíamos) duraznos en el campo.

Al Dr. Herman Silva, agradezco el tiempo dedicado a enseñarme, a guiarme y haberme hecho una mejor profesional. Gracias por las grandes conversaciones y discusiones.

A la Dra. Lee Meisel y Andrea M., por la secuencia de PME. A los miembros del MemLab, Patricia, Vicki y especialmente a Claudia. A los miembros del ex- Lab. Genética Molecular Vegetal, Dra. Liliana Cardemil y Angélica, especialmente a Lorena N., Lorena M., Francisca y Viviana, por haberme prestado su apoyo y enseñarme y darme algo más que ciencia; amistad. A todos los miembros del Ex-GenMolVeg y actual Centro de Biotecnología Molecular.

Agradezco a Sofía, Carola, Víctor y Marcelo, por su amistad y animarme y apoyarme a seguir adelante. A Jorge, por su incansable paciencia, cariño y ánimo.

ÍNDICE GENERAL



AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Hipótesis.....	7
1.3 Objetivo General.....	7
1.4 Objetivos Específicos	7
2 MATERIALES Y MÉTODOS	8
1.5 Material Biológico.....	8
2.1.1 Obtención de <i>Prunus persica</i>	8
2.1.2 Bacterias y Condiciones de cultivo.....	10
1.6 Plásmidos.....	10
1.7 Diseño de Partidores.....	10
1.8 Anticuerpos.....	11
2.4.1 Anticuerpo primario.....	11
2.4.2 Anticuerpo secundario.....	11
1.9 Reactivos.....	12
1.10 Parámetros fisiológicos de <i>Prunus persica</i> en la determinación de la harinosidad.	13
2.6.1 Firmeza de los frutos.....	13



2.6.2 Jugo extraíble.....	13
2.6.3 Determinación de la harinosidad.....	14
2.7 Técnicas generales de biología molecular.....	15
2.7.1 Preparación de células competentes de <i>Echerichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	15
2.7.2 Transformación de células competentes de <i>Echerichia coli</i> (<i>E.coli</i>).....	15
2.7.3 Minipreparación de DNA plasmidial	16
2.7.4 Electroforesis de DNA	16
2.7.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	17
2.7.6 Secuenciación.....	17
2.8 Análisis de la expresión de los genes de PG, PME y Exp.....	17
2.8.1 Extracción de RNA total.....	17
2.8.2 Calidad de RNA.....	18
2.8.2.1 Índice de calidad razón A_{260}/A_{280} nm.....	18
2.8.2.2 Gel agarosa denaturante.....	18
2.8.3 Obtención de sondas radioactivas.....	19
2.8.4 Northern blot.....	20
2.9 Preparación de proteínas para PG.....	22
2.9.1 Extracción de proteínas para ensayos actividad de PG.....	22
2.9.2 Ensayo de actividad para PG.....	22
2.10 Ensayo de actividad PME.....	23
2.10.1 Extracción de proteínas para ensayos actividad de PME.....	23
2.10.2 Ensayo de actividad para PME.....	23
2.11 Análisis de Western blot para el gen de Expansina de <i>Prunus persica</i> . 24	
2.11.1 Extracción de proteínas para análisis de Western blot.....	24
2.11.2 Separación de proteínas en electroforesis de geles SDS-PAGE..	25



2.11.3 Transferencia de proteínas desde gel de poliacrilamida a membrana de nitrocelulosa.....	25
2.11.4 Western blot Expansina.....	26
3 RESULTADOS.....	27
3.1 Susceptibilidad varietal al daño por frío.....	27
3.2 Cantidad de jugo extraíble para las variedades Fancy Lady y O'Henry....	29
3.3 Obtención de cDNA parciales para los genes de PG, PME y Exp.....	31
3.4 Análisis del patrón de expresión y de las actividades enzimáticas y proteína para los genes Poligalacturonasa, Pectina Metilesterasa y Expansina de <i>Prunus persica</i> , respectivamente.....	37
3.4.1 Análisis de expresión génica del gen de Poligalacturonasa de <i>Prunus pérsica</i> (PpPG) durante la postcosecha en las variedades de duraznos Fancy Lady y O'Henry	37
3.4.2 Análisis de actividad enzimática del gen de PpPG durante la postcosecha en variedades de duraznos Fancy Lady y O'Henry.....	41
3.4.3 Análisis de expresión génica para el gen de Pectina metilesterasa de <i>Prunus pérsica</i> (PpPME) durante la postcosecha, en variedades de duraznos Fancy Lady y O'Henry.....	45
3.4.4. Análisis de la actividad enzimática de PME durante la postcosecha, en variedades de duraznos Fancy Lady y O'Henry.....	48
3.4.5 Análisis de expresión del gen de Expansina (Exp) de <i>Prunus persica</i> durante la postcosecha, en variedades de duraznos Fancy Lady y O'Henry.....	52
3.4.6 Análisis del contenido de la proteína Expansina de <i>Prunus persica</i> durante la postcosecha, en variedades de duraznos Fancy Lady y O'Henry.....	54

3.4.7 Análisis de las razones de las actividades enzimáticas de Poligalacturonasa y Pectina Metilesterasa de <i>Prunus persica</i>	57
4 DISCUSIÓN.....	59
5 CONCLUSIONES.....	67
6 BIBLIOGRAFÍA.....	68



ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1: Porcentaje de jugo extraíble de las variedades DFL y DOH.....	30
Figura 2: Amplificación cDNA parcial.....	32
Figura 3A: Alineamiento de cDNA parcial de PpPG.....	34
Figura 3B: Alineamiento de cDNA parcial de PpExp.....	35
Figura 3C: Alineamiento de cDNA parcial de PME.....	36
Figura 4: Análisis de expresión génica del gen PpPG de <i>Prunus persica</i>	40
Figura 5: Análisis de la actividad enzimática para el gen PpPG de <i>Prunus persica</i>	43
Figura 6: Resumen de la expresión y actividad enzimática de PG para la var. Fancy Lady	44
Figura 7: Resumen de la expresión y actividad enzimática de PG para la var. O'Henry.. ..	44
Figura 8: Análisis de expresión génica para el gen PpPME de <i>Prunus persica</i>	47
Figura 9: Análisis de la actividad enzimática para el gen PpPME de <i>Prunus persica</i>	50
Figura 10: Resumen de la expresión y actividad enzimática de PME para la var. Fancy Lady	51
Figura 11: Resumen de la expresión y actividad enzimática de PME para la var. O'Henry.....	51
Figura 12: Análisis de expresión génica para el gen PpExp de <i>Prunus persica</i>	53
Figura 13: Inmunodetección de PpExp en variedades Fancy Lady y O'Henry, utilizando anticuerpo LeExp1 de tomate.....	55

Figura 14: Resumen de la expresión y acumulación de proteína de Exp para la var.

Fancy Lady56

Figura 15: Resumen de la expresión y acumulación de proteína de Exp para la var.

O'Henry.....56



ÍNDICE DE TABLAS y ESQUEMAS

Esquema 1: Representación de la toma de muestra de duraznos y los diferentes tratamientos realizados.....	9
Tabla 1: Principales desórdenes fisiológicos y duración máxima en almacenaje refrigerado (0°C) en distintas variedades de duraznos y nectarinos.....	28
Tabla 2: Análisis de las razones de actividad enzimática para Poligalacturonasa y Pectina Metilesterasa (PG/PME) de ambas variedades de <i>P. persica</i> , en las distintas condiciones de almacenamiento.	58



ABREVIATURAS

- 15M:** Fruto 15 días almacenado a 0°C y Maduro
- 30M:** Fruto 30 días almacenado a 0°C y Maduro
- A₆₂₀:** Absorbancia 620 nm. (ó 260, 280 nm, según corresponda)
- AcNa:** Acetato de Sodio
- CTAB:** Bromuro hexadecil trimetilamonio
- DEPC:** Dietil pirocarbonato
- DFL:** Durazno variedad Fancy Lady
- DMSO:** Dimetil Sulfóxido
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- DOH:** Durazno variedad O'Henry
- DTT:** Ditioneitol
- EDTA:** Ácido etilendiamino tetra-acético
- Exp:** Expansina
- F15:** Fruto almacenado en Frío (0°C) por 15 días
- F30:** Fruto almacenado en Frío (0°C) por 30 días
- HCl:** Ácido Clorhídrico
- IAA:** Alcohol Isoamílico
- LB:** Medio de cultivo de bacterias Luria Bertoni
- MOPS:** Ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfónico
- N:** Newton; Medida de fuerza
- NaCl:** Cloruro de Sodio
- NaOH:** Hidróxido de Sodio
- pb:** Pares de bases nucleotídicas
- PCR:** Reacción de la Polimerasa en Cadena
- PEG:** Polietilenglicol

PG: Poligalacturonasa

PME: Pectina Metilesterasa

PpExp: Expansina de *Prunus persica*

PpPG: Poligalacturonasa de *Prunus persica*

PpPME: Pectina Metilesterasa de *Prunus persica*

PSA: Persulfato de Amonio

PVPP: Polivinilpirrolidona

RNA: Ácido ribonucléico

rRNA: RNA ribosomal

RT-PCR: Transcripción Reversa de la reacción de la Polimerasa en Cadena

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

SSC: Amortiguador de citrato salino estándar

TB: Buffer de transformación (transformation buffer)

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamina

X-GlcA : 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido

RESUMEN

Los cambios físicos y fisiológicos producidos en *Prunus persica* por la exposición a bajas temperaturas, han generado gran inquietud en el sector exportador porque la calidad del producto se deteriora, y esto produce pérdidas económicas. El principal síntoma descrito después de almacenar los frutos en frío es la harinosidad de la pulpa. Hasta el presente se desconocen los mecanismos moleculares que originan la harinosidad de la pulpa, sin embargo; se ha planteado que durante el almacenamiento en frío, ocurren alteraciones en la actividad de enzimas involucradas con la pared celular de los frutos, como son la Poligalacturonasa (PG), enzima que degrada las pectinas y la Pectina Metilesterasa (PME), la cual desmetila el ácido poligalacturónico de la pared celular. Otra proteína involucrada en la maduración de los frutos es la Expansina (Exp), que disminuiría la interacción entre los polisacáridos de la pared celular, influyendo en el ablandamiento. Para analizar la participación de estas proteínas en la susceptibilidad de los frutos a tornarse harinosos, se evaluaron distintas variedades de *Prunus persica* con el fin de identificar variedades con alta y baja susceptibilidad a tornarse harinosas. De esta forma se determinó que la variedad Fancy Lady presentaba una baja susceptibilidad mientras que la variedad O'Henry mostró una alta susceptibilidad. En estas dos variedades se analizaron la abundancia de los mRNA para PG y Exp, los que mostraron una disminución marcada en la pulpa de los frutos mantenidos en frío. Esta situación revirtió en los frutos maduros, en los que se observó una acumulación de los mRNAs. Esto correlaciona con la disminución en actividad enzimática de PG y la disminución de la proteína de Exp analizada por western blot en los frutos mantenidos en frío. La actividad Poligalacturonasa y el contenido de Expansina se incrementaron al madurar los duraznos almacenados en frío. Respecto a Pectina Metilesterasa, la abundancia del

mRNA disminuyó en frutos almacenados en frío, sin llegar a desaparecer. Cuando el fruto maduró, la abundancia de mRNA de PME aumentó, al igual que su actividad enzimática. La comparación de frutos maduros sanos y harinosos, mostró un menor nivel de Exp en el fruto harinoso. Sin embargo, los datos muestran que la actividad de PME no cambia, mientras que la actividad de PG disminuye en los frutos harinosos. Análisis de las razones de actividad enzimática de PG/ PME de *P. persica* mostraron ser menores en los frutos harinosos respecto de un fruto que tiene jugo. Los resultados indican que el almacenamiento en frío produce un desbalance en enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo de la pared celular.

SUMMARY

Physical and physiological changes produced in *Prunus persica* by the exposure to low temperatures, have generated great concern in the exporting sector because the quality of the product is deteriorated, leading to economical losses. The main symptom after cold storage is mealiness in the pulp of the fruit. Until now the molecular mechanisms that cause the mealiness are not known, nevertheless; it has been proposed that during the cold storage, there are changes in the activity of enzymes involved in cell wall metabolism in the fruits such as Polygalacturonase (PG), an enzyme that degrades pectin and Pectin Methylesterase (PME), an enzyme that demethylate polygalacturonic acid in the cell wall. Another protein involved in the ripening of the fruit is Expansin (Exp), which would decrease the interaction between polysaccharides in the cell wall, affecting the fruit softening. In order to analyze the role of these proteins in the susceptibility of the fruits to become mealy, we evaluated different varieties of *Prunus persica* to identify varieties with high and low susceptibility to become mealy. Thus, we found that the variety Fancy Lady showed a low susceptibility whereas the variety O'Henry showed a high susceptibility. In these two varieties the mRNA abundance for PG and Exp were analyzed, and in both case we found a striking decrease in the pulp of the fruits kept in the cold. This situation reverted in the mature fruits, where an accumulation of both mRNAs was observed. This correlates with a decrease in the enzymatic activity of PG and a reduction of the Exp protein, analyzed by western blot, in the fruits kept in the cold. Both the PG activity and the content of Expansin increased upon softening of the fruit stored in the cold. Regarding Pectin Methylesterase, the abundance of the mRNA decreased in fruits stored in the cold, but it did not disappear. Upon softening, the abundance of the mRNA for PME increased as it did the enzymatic activity. The comparison of normal and mealy mature fruits, showed

lower levels of Exp in the mealy fruit. However, the data showed no change in PME activity, whereas the PG activity diminishes in the mealy fruits. Analyses of the ratio between the PG/ PME enzymatic activities of *P. persica* showed to be smaller in the mealy fruits respect to a fruit that has juice. These results indicate that cold storage produces an imbalance in enzymes and proteins involved in cell wall metabolism.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de frutales de carozo, particularmente del género *Prunus* constituye una importante actividad económica para Chile. En la temporada 2002-03, los frutos de carozo, como duraznos, nectarines, y ciruelas, representaron el 15% del total de superficie plantada, concentrándose en la región Metropolitana y Sexta. Chile entre estos períodos exportó 190.000 toneladas de frutos de carozos, representando el 10% del total de exportaciones de fruta fresca (A.N.A. Chile y Asociación de Exportadores de Chile, 2004).

Para llegar oportunamente a los mercados de interés con un producto de óptima calidad, la cosecha de los frutos de carozo se debe realizar en un tiempo específico, anterior a alcanzar la madurez de consumo, lo que implica delegar a la cadena de postcosecha de los frutos, la mantención de la calidad de éstos y la maduración final. Desafortunadamente, la etapa de almacenamiento y transporte de los frutos para la exportación implican una serie de cambios físicos y/o fisiológicos inducidos en los frutos por la exposición a bajas temperaturas durante el almacenaje refrigerado, llevando a la expresión de síntomas característicos que constituyen el denominado "daño por frío". Los frutos dañados tienen una buena apariencia externa cuando son removidos del almacenamiento, etapa en la cual el fruto aún esta firme en su pulpa, pero cuando madura ó alcanza una firmeza de su pulpa apta para ser consumido, su apariencia no es óptima para comercializarlo. El mayor síntoma de este daño por frío es la harinosidad de la pulpa (Ben-Arie y Sonego, 1980; Von Mollendorff y col., 1992; Zhou y col. 2000a). Esta adquiere relevancia cuando duraznos y nectarines son exportados a mercados lejanos como Estados Unidos, Europa ó Asia, lo que

implica al menos un par de semanas de transporte y por lo tanto de exposición a temperaturas bajas. Una vez en el mercado de destino, es el consumidor quien se encuentra con un fruto de baja calidad, debido a que este problema no es detectado externamente e inhabilita totalmente a la fruta para su consumo. Esto se transforma en una abierta desventaja frente a países como Sudáfrica, quien puede llegar a los mercados europeos en un plazo de una semana.

La harinosidad se manifiesta en todas las variedades de frutales de carozo. Sin embargo, algunas variedades de nectarines y duraznos son mucho más susceptibles, viéndose afectados desde un 40% a 100% de los frutos (Luchsinger, 1996a). Las variedades de frutales de carozo que se cultivan en Chile son altamente susceptibles a desarrollar este desorden fisiológico. Este hecho se debe a que tales cultivares se han desarrollado buscando principalmente características de calidad externa (color y tamaño). El mejoramiento genético, en general, ha excluido la característica de almacenamiento y transporte, ya que no representa un problema en los países en donde se realiza dicho mejoramiento (Retamales, 1996; Luchsinger, 1996b y 1997).

La harinosidad se ha definido como un desorden fisiológico de duraznos y nectarines donde falla el proceso de maduración normal después de períodos prolongados de almacenamiento en frío, resultando en una pérdida de jugo y una textura seca y harinosa (Von Mollendorff y De Villiers, 1988; Zhou y col. 2000b).

La maduración del fruto son eventos genéticamente programados caracterizada por un número de procesos que alteran el color sabor, aroma y textura del fruto (Brady, 1987). Una de las hipótesis planteadas para explicar la génesis de la harinosidad

involucra a la pared celular de los frutos, específicamente el cambio de textura de la pulpa ó ablandamiento que ocurre durante el proceso de maduración. Durante este proceso los polisacáridos de la pared celular de los duraznos, sufren alteraciones como son la degradación de las pectinas (Von Mollendorff y De Villiers, 1988; Dawson y col., 1992; Lurie y col., 1994; Giovannonni, 2004). Las pectinas están compuestas principalmente de ácido galacturónico, el cual posee grupos carboxilo que pueden encontrarse esterificados por grupos metilos. Se sabe que las pectinas son polimerizadas en el cis Golgi, metil-esterificadas en el medial Golgi y sustituida en sus cadenas laterales en las cisternas del trans Golgi, siendo las pectinas luego secretadas a la pared en una forma altamente metil-esterificada (Ridley y col., 2001; Willats y col., 2001). Esta metilación disminuye la carga negativa de ellas, disminuyendo la capacidad gelificante de las pectinas de alto peso molecular (Micheli, 2001). Durante los estados iniciales de maduración, en la pared celular ocurre la solubilización de estos polímeros ricos en ácido urónico de alto peso molecular, posteriormente, las cadenas laterales de galactanos son removidos desde polímeros pécticos retenidos en fracciones de la pared celular, disminuyendo, por ejemplo, el grado de metilación en estas fracciones, estos cambios coinciden con la gran pérdida de firmeza e incremento del contenido de jugo extraíble. Después de 2 días de maduración, los polímeros ricos en ácido urónico solubilizados son depolimerizados a especies de bajo peso molecular (Dawson y col, 1992; Lester y col., 1994). Estos cambios en la composición de la pared celular de los frutos, en parte son debidos a la expresión de enzimas responsables de la degradación de las pectinas, siendo esto uno de los factores involucrados en el ablandamiento de los frutos. Estas enzimas son la Poligalacturonasa (PG) la cual hidroliza el enlace α -1,4 el ácido galacturónico, produciendo polímeros de ácido galacturónico de menor peso molecular; y la Pectina

metilesterasa (PME), que hidroliza la unión éster del galacturónido metilado, produciendo un polímero cargado negativamente y metanol (Callahan y col., 1993; Frenkel y col., 1998; Zhou y col., 2000b; Micheli, 2001; Willats y col., 2001). A estas enzimas se les ha medido su actividad observando que durante la normal maduración la actividad de PG aumenta y la actividad de PME disminuye (Zhou y col., 2000b, Lurie y col., 2003).

Las primeras investigaciones sobre la causa bioquímica de la harinosidad se dirigieron al estudio de las diferencias relativas de las pectinas observadas, cuando se comparan fracciones de pared celular entre frutos jugosos y harinosos. En los frutos harinosos se encontró que los polímeros solubilizados son de alto peso molecular y no son depolimerizados a bajo peso molecular. Durante el almacenaje en frío, las pectinas en la pared son de-esterificadas, sugiriendo una continua actividad de PME a bajas temperaturas. Las pectinas ramificadas acumuladas en la pared celular y las cadenas laterales de galactanos, los cuales son removidos desde el esqueleto de pectinas durante los estados iniciales de normal maduración, permanecen unidos al esqueleto en los frutos harinosos (Ben-Arie y Lavee, 1971). Los antecedentes anteriores han llevado a postular que la disminución en actividad de la Poligalacturonasa (Zhou y col. 2000a y b), combinada con una continua de-esterificación de la pectina, como resultado de la actividad de la enzima PE conduce a la formación de un gel de pectinas (Ben -Arie y Sonego, 1980, Lurie y col., 2003) y se cree que la pectina en esta forma une el agua libre en el tejido y produce la característica de textura seca de la pulpa. En respaldo a esta idea se ha mostrado que un incremento en la razón de actividades PG/PE por medio de la aplicación de calentamiento intermitente (Intermittent warming,

IW) y/o condiciones de atmósfera controlada de almacenaje, pueden inhibir el desarrollo de harinosidad (Zhou y col. 2000a y 2001).

Otra proteína involucrada en la maduración de los frutos es la Expansina (Rose y Benett, 1997; Rose y col., 2000), la que disminuiría la interacción entre los polisacáridos de la pared celular, situación que produciría cambios en la organización de los polisacáridos y por lo tanto influiría en el ablandamiento del fruto. El mecanismo preciso no es conocido y se ha sugerido que Expansina se une a la interfase entre las microfibrillas de celulosa y la matriz de polisacáridos, interrumpiendo la unión de interacciones no covalentes entre estos componentes poliméricos (McQueen-Mason y Cosgrove, 1994; Cosgrove y col., 2002).

Recientemente se ha mostrado que la supresión de una proteína de Expansina relacionada con la maduración (Exp1) en plantas transgénicas de tomate resulta en una marcada disminución en la degradación de polímeros de urónidos como la pectina sin una aparente acción directa de Exp1 sobre el quiebre del esqueleto de la pectina (Brummell y col., 1999a). El autor especula que Exp1 influye la degradación de pectinas por alteración en la manera por la cual PG interactuaría con estos substratos pécticos.

No obstante, la expresión de una Expansina específica de frutos durante las etapas de ablandamiento de la fruta y la interrupción de la pared, sugiere que las Expansinas pueden funcionar en el desmontaje de la pared celular (Cosgrove D., 1998 y 2000).

Los estudios anteriormente mencionados fueron todos realizados en una sola variedad de durazno o nectarino. Sin embargo, no queda claro si la susceptibilidad que presentan distintas variedades de duraznos y nectarinos a tornarse harinosos, se debe a características específicas de la variedad estudiada. En base a la hipótesis planteada en la literatura se podría especular que variedades con distinta susceptibilidad a tornarse harinosas podrían presentar niveles de PG, PME y Exp que correlacionan con el grado de harinosidad. De esta forma, en esta tesis, se ha decidido estudiar cuáles son los cambios que ocurren en PG, PME y Exp en dos variedades que poseen distinto grado de susceptibilidad al almacenamiento a bajas temperaturas.

En base a los antecedentes anteriormente expuestos, en esta memoria se plantea la siguiente hipótesis:

HIPOTESIS

Durante el almacenamiento en frío, la susceptibilidad diferencial a la harinosidad en distintas variedades de duraznos depende de la expresión y/o de la actividad de Poligalacturonasa, Pectina Metilesterasa y de la expresión y acumulación de Expansina.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar en variedades que presentan susceptibilidad diferencial a la harinosidad los cambios que ocurren en Poligalacturonasa, Pectina Metilesterasa y Expansina, durante distintas condiciones de postcosecha.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

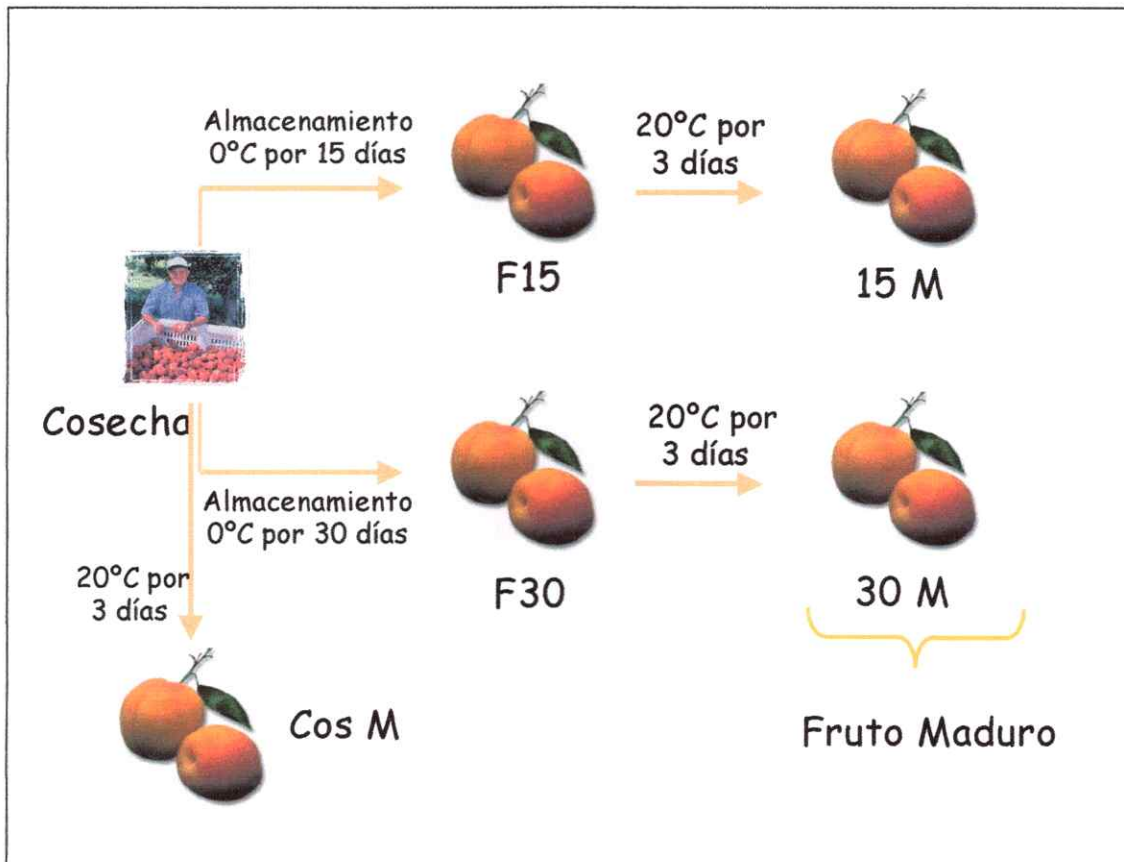
- 1.- Identificar variedades de duraznos con diferencias en la susceptibilidad durante el almacenamiento a bajas temperaturas.
- 2.- Obtener los cDNA parciales que codifican para Poligalacturonasa (PG), Pectina Metilesterasa (PME) y Expansina (Exp) de *Prunus persica*.
- 3.- Analizar el patrón de expresión de los genes de PG, PME y Exp durante la maduración de los duraznos almacenados a temperatura ambiente y en condiciones de almacenamiento que promueven la harinosidad de los frutos.
- 4.- Medir las actividades enzimáticas de PG y PME; medir la acumulación de la proteína de Exp, en distintas condiciones de almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material biológico

2.1.1. Obtención de *Prunus persica*

Frutos de duraznos (*Prunus persica*) en estado de madurez de cosecha fueron obtenidos desde huertos de la zona de Graneros. Los frutos fueron lavados con solución de HCl 100 ppm y luego colocados en una cámara de almacenamiento con una temperatura de 0°C, siendo almacenados por períodos de 15 y 30 días (F15 y F30: 15 y 30 días almacenados a 0°C) para su posterior evaluación (Esquema 1). Frutos de cosecha no sometidos a temperatura de 0°C fueron usados como control. Los frutos después de períodos de almacenaje de 15 y 30 días, fueron puestos en la cámara de maduración con una temperatura de 20°C, hasta que los frutos alcanzaran una resistencia de la pulpa a la presión en la zona ecuatorial del fruto de 8,9- 17,8 N (Fruto Maduro; madurez de consumo), condición en la cual también se evaluó (15M y 30M: Frutos a 15 y 30 días almacenados y luego madurados a 20°C, Esquema 1). En los frutos de cosecha usados como control y en los de cada período de evaluación se tomó una fracción del fruto desde uno de sus ecuadores y se congeló en nitrógeno líquido para los análisis posteriores de expresión de genes y mediciones de actividad enzimática.



Esquema 1: Representación de la toma de muestra de duraznos y de los diferentes tratamientos realizados. **CosM:** Fruto de durazno proveniente de la Cosecha que fue almacenado por 3 días a 20°C. **F15** y **F30:** Frutos de duraznos almacenados por 15 y 30 días respectivamente, a 0°C. **15M** y **30M:** Frutos de duraznos que se almacenaron por 15 y 30 días respectivamente, y posteriormente almacenados en cámaras de 20°C por 3 días para que maduraran.

2.1.2. Bacterias y condiciones de cultivo

Para los clonamientos se utilizaron bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 α . Se crecieron en medio Luria Bertoni (LB) líquido (bacto triptona 1% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v y NaCl 1% p/v) o sólido (Medio LB con agar 1,5% p/v) a 37° C por 16 horas.

2.2. Plásmidos

- H8B10T7: Plásmido bluescript SK, que contiene el EST del RNA ribosomal 18S de *Arabidopsis thaliana*. (Donado por Arabidopsis Biological Resource Center).
- pGEM[®]-T Easy Vector System: Vector para clonamiento de la empresa Promega (Madison, WI, USA),

2.3. Diseño de partidores

Los partidores utilizados para la amplificación de cDNA parciales de los genes de PG, PME y Exp fueron diseñados a partir de la base de datos publicada por NCBI (National Center for Biotechnology Information). Estos partidores se diseñaron desde zonas conservadas de las secuencias encontradas para PG, PME y Exp., tanto para duraznos, como para otras secuencias de fruta publicadas. Adicionalmente, se obtuvieron los partidores para PME de duraznos (PMEAM) los cuales fueron donados por la Dra. Lee Meisel, Lab. Genética Molecular Vegetal, Universidad de Chile. Las secuencias de los partidores se muestran en el siguiente recuadro.

Partidor	Secuencia nucleotídica
PpPG03 Sence	5'- CAGGTGGAATTCTTGACGG-3'
PpPG03 Antisence	5'- TCCCCCATGACTTGATTCT- 3'
PpPME5'	5'- GGGTTCATAGCAAGAGACA-3'
PpPME3'	5'-TCGTTGAACACTTGATAGCC-3'
PpExp5'	5'-GAGGTGCTTGTGGATATGGAA-3'
PpExp3'	5'-ACAGCATTGCTGGTCACAG-3'
*BG2	5'-CACCGATGCCACAGTTGTGTTCCAA-3'
*BG3	5'-TTAAACCCCAAATTCTGCAGTA-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'

*Partidores diseñados por Andrea Morales, Lab. Genética Molecular Vegetal, U. de Chile.

2.4. Anticuerpos

2.4.1. Anticuerpo anti-expansina de *Lycopersicum esculatum* (LeExp1)

Anticuerpo policlonal Anti-Expansina 1 de *Lycopersicum esculatum* (Rose y col., 2000), facilitado por el Dr. Jocelyn Rose, Department of Plant Biology, University Cornell, Ithaca, NY, USA.

2.4.2. Anticuerpo secundario

Anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa conjugada Horseradish (HRP) (SIGMA).

2.5. Reactivos

- Se obtuvieron las columnas Sephadex G-50 y la membrana Hybond-N+ de Amersham-Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia).
- Las enzimas de restricción y DNA ligasa de BioLabs (New England, USA).
- Enzimas de restricción, DNA polimerasa, el sistema de marcación Hexalabel DNA y el marcador de peso molecular de DNA de 1 Kb se obtuvieron de Fermentas (Vilnius, Lituania).
- El sistema de purificación de productos de PCR "CONCERT", agarosa, el sistema de transcripción reversa (RT-PCR), medios de cultivo de bacterias y marcadores de peso molecular para RNA se obtuvieron de Gibco (Invitrogen, Grand Island, NY, USA).
- Los solventes de grado analítico y las sales se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania).
- El [α -³²P]-dCTP se obtuvo de Perkin Elmer Life Science (Boston, USA).
- El sistema de purificación de DNA plasmidial "Wizard" y el vector para clonamiento pGEM[®]-T Easy Vector System se obtuvo de Promega (Madison, WI, USA).
- Los antibióticos, el sustrato X-GlcA (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido), membrana de nitrocelulosa de 2 micrones, enzimas comerciales de Pectinasas y Pectina Metilesterasa y reactivos químicos generales, se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

2.6. Parámetros fisiológicos de *Prunus persica* para determinación de la harinosidad.

2.6.1. Firmeza de los frutos

La resistencia de la pulpa a la presión (firmeza) fue medida en las zonas ecuatoriales (mejillas) del fruto, determinada a partir de 90° de la sutura del fruto. Después de removida la epidermis, se midió la resistencia de la pulpa a la presión con un penetrómetro McCormick (Fruit Tech; Yakima, Washington) Modelo FT 011 (rango de 0 a 49 N) para frutos blandos y un FT 327 (rango de 13,4 a 120,3 N) para frutos firmes, utilizado para la cosecha y en frutos inmediatamente salidos del almacenamiento en frío, ambos modelos utilizados con una punta de 7.9 mm de diámetro. La medición de la firmeza se presenta en Newton (N) para cada variedad (Luchsinger, 1996a)

2.6.2 Jugo extraíble

La cantidad de jugo extraíble fue medida usando una modificación del método de Lill y Van der Mespel (1988). Una vez que los frutos maduros han alcanzado una firmeza en los ecuadores de aproximadamente 8,9-17,8 N de presión, después de haber permanecido en la cámara de 20°C, con un sacabocado de aprox. 1,5 cm de diámetro, se extrajo mesocarpio de fruto (cerca de 3 g), y se introdujo dentro de una jeringa desechable de 5 mL (sin aguja) y forzado a través del tubo con el émbolo para alcanzar una homogenización suave. El homogenizado fue colectado en un tubo de centrifuga, pesado (3 g) y centrifugado a 12.000 g por 20 minutos en una centrifuga Digital Selecta, modelo Meditronic BL. El jugo sobrenadante fue separado por escurrimiento, pesado y expresado como un porcentaje del peso total de la muestra inicial (Luchsinger, 1996a).

2.6.3. Determinación de la Harinosidad

Para determinar la harinosidad de los duraznos almacenados, primero, los frutos de cosecha fueron madurados en cámaras de 20°C. Diariamente se evaluaron los frutos en su firmeza y contenido jugo hasta que alcanzaron una firmeza en sus ecuadores de 8,9-17,8 N. A partir de las mediciones de firmeza de una zona ecuatorial y su respectivo contenido de jugo extraíble, se confeccionaron curvas que relacionan estos parámetros para cada variedad. La ecuación de regresión es considerada como base para la interpretación objetiva de la harinosidad, siendo posible determinar si el contenido de jugo del fruto evaluado tiene alguna dependencia directa con la firmeza, aceptando un valor de R^2 igual o superior a 0.6 para dicha relación. Por lo tanto, para determinar el grado de harinosidad en frutos almacenados, se compararon sus valores de firmeza y contenido de jugo con los de la curva ó ecuación de regresión de Firmeza- CJ determinados primeramente en los frutos de cosecha para cada variedad, (frutos que se consideran como sanos), determinando así el porcentaje del fruto sano, ó por diferencia de este porcentaje, el porcentaje o grado de harinosidad que el fruto almacenado puede sufrir. En el caso que no exista una relación de Firmeza- CJ para la variedad evaluada, se consideró el valor promedio de las mediciones de contenido de jugo de los frutos no almacenados (sin el efecto del daño por frío), de este modo, el porcentaje de jugo obtenido representa a un fruto 100% sano, determinando el grado de harinosidad de los frutos almacenados como anteriormente se describió (Luchsinger, 1996a).

2.7. Técnicas generales de Biología Molecular

2.7.1. Preparación de células competentes de *Echerichia Coli* (*E. Coli*)

Se utilizó el método descrito por Inoue (Inoue y col., 1991). Se inoculó 250 mL de medio SOB (bacto triptona 2% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM) con un precultivo de *E. Coli* DH5α crecido durante 16 horas a 37°C, y se creció a 23°C con agitación vigorosa hasta una O.D. a 600 nm de 0,6 unidades de absorbancia. El cultivo se enfrió en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 2.500g por 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 80 mL de tampón TB frío (Buffer Transformación: Pipes 10 mM, MnCl₂ 55 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM), se incubó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 2500g por 10 minutos a 4°C. Finalmente el pellet se resuspendió en 20 mL de tampón TB frío, y se agregó DMSO a una concentración final de 7% v/v e incubó en hielo por 10 minutos. Las células se congelaron en nitrógeno líquido en alícuotas de 200 µL y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

2.7.2. Transformación de células competentes de *Echerichia Coli* (*E. Coli*)

Se utilizó el método por shock térmico (Inoue y col, 1991) en el cual a 50 µL de células competentes, se le agregaron de 1 a 5 µL de DNA. La mezcla se incubó 30 minutos en hielo, luego 5 minutos a 37°C y finalmente 5 minutos en hielo. A continuación se agregó 1 mL de medio LB sin antibiótico y se incubó por 1 hora a 37°C. Posteriormente se sembraron sobre una placa de LB/ agar y se incubó a 37°C toda la noche.

2.7.3. Minipreparación de DNA plasmidial

Se crecieron las cepas transformantes en LB/ Ampicilina (100 ug/ mL) a 37°C con agitación constante toda la noche, y luego se tomó 1,5 mL del cultivo y se centrifugó a 12.000g por 30 seg. El pellet obtenido se resuspendió en 100 µL de la solución I (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8 y EDTA 10 mM pH 8) y se agregaron 200 µL de la solución II (NaOH 0,2 M y SDS 1%) mezclando por inversión 5 veces, trabajando siempre en hielo. Se agregaron 150 µL de solución III (Acetato de Potasio 5 M pH 4,7) agitando en un vortex por 10 seg. y manteniendo el tubo en hielo aproximadamente 5 minutos. Se centrifugó a 12.000g por 5 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo agregando un volumen igual de Fenol: Cloroformo y se agitó en vortex. Se centrifugó por 2 minutos a 12.000g y posteriormente se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. El DNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol, incubándolo por 30 minutos a -20°C. Se centrifugó a 12.000g por 5 min. (4°C) y luego se dejó secando el pellet a temperatura ambiente. Se lavó el pellet con 1mL de etanol 70% (4°C) y se dejó secando. La resuspensión del pellet se hizo en 40 µL de agua estéril con RNasa (20 µg /mL) incubándolo a 37°C por 10 minutos (Xiang y col., 1994).

2.7.4. Electroforesis de DNA

Para separar fragmentos de DNA de tamaños entre 150 a 900 pb, se realizaron electroforesis horizontales de agarosa al 1% p/v, en tampón TAE (Tris 40 mM, CH₃COONa 20 mM, EDTA 2 mM pH 8). Como marcador de peso molecular se utilizó el estándar de 1 Kb de Fermentas®

2.7.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para todas las reacciones de PCR se utilizó DNA polimerasa Taq Fermentas® (Vilnius, Lituania), en su correspondiente tampón, mezcla de nucleótidos 0,2 mM, Cloruro de Magnesio 1,5 mM, y 12 pmoles de partidores. La cantidad de templado utilizada fue de aproximadamente 10 ng. La temperatura de apareamiento y el tiempo de extensión utilizada para las amplificaciones desde DNA plasmidial fue de 50°C para el gen de Expansina, 58°C para el gen de Poligalacturonasa y de 50°C para el gen de PME, por 1,5 minutos para cada uno.

2.7.6. Secuenciación

Los cDNA parciales obtenidos para los genes de Poligalacturonasa y Expansina clonados, se secuenciaron en el Centro de Síntesis y Análisis de Biomoléculas de la Universidad de Chile.

2.8. Análisis de la expresión de los genes PG, PME y Exp.

2.8.1. Extracción de RNA total.

Método descrito originalmente por Chang y col. (1993). Diez mililitros de solución de extracción (CTAB 2%, PVPP K30 2%, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 25 mM, NaCl 2 M, espermidina 0,5 g/L y Beta-mercaptoetanol 2%) se calentaron a 65°C en baño de agua y se agregaron rápidamente 4 gr de mesocarpio de durazno molido previamente en Nitrógeno líquido mezclando con la solución de extracción. Se incubó por 15 minutos a 65°C mezclando de vez en cuando suavemente. Luego se extrajo 2 veces con igual volumen de Cloroformo:IAA (24:1), separando las fases mediante centrifugación a 12.000g por 15 minutos a temperatura ambiente. La fase superior se transfirió a un tubo limpio y se agregó 1/4 volumen de LiCl 10 M, dejando precipitar los

ácidos nucleicos toda la noche a 4°C, sedimentando posteriormente por centrifugación a 12.000g por 30 minutos. El precipitado se disolvió en 500 µL de SSTE (NaCl 1 M, SDS 0,5%, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 1 mM pH 8,0), para luego extraer una vez con igual volumen de Cloroformo:IAA (24:1). Se agregó 2 volúmenes de etanol absoluto al sobrenadante y se dejó precipitando a -70°C por 30 minutos. Se volvió a centrifugar para obtener el precipitado de RNA. Se lavó el pellet con etanol 75% y se dejó secar. Por último se resuspendió el RNA en Agua-DEPC ultra pura (Chang y col., 1993; Gehrig y col., 2000).

2.8.2. Calidad de RNA

La calidad del RNA se verificó de dos maneras:

2.8.2.1. Índice de calidad razón A_{260}/A_{280} nm.

Para tener una aproximación que la extracción de RNA quedó libre de contaminantes como los polisacáridos propios de la muestra, se midieron las absorbancias a 260 nm, correspondiente a la longitud de onda donde absorben los ácidos nucleicos y a 280 nm, longitud de onda donde absorben los polisacáridos. La razón entre estas dos longitudes (A_{260}/A_{280}) con un valor entre 1,7 y 2 indica una buena calidad del RNA total (dato no mostrado).

2.8.2.2 Gel agarosa denaturante.

Una alícuota de las muestras se cargaron en un gel de Agarosa al 1,5% en condiciones denurantes (Formaldehído 3% v/v, 10% v/v tampón MOPS 10X (MOPS ácido 0,2 M, Acetato de Sodio 0,05 M, Na₂EDTA 0,01 M)). Antes de cargar las muestras en el gel, se denaturaron con 3 volúmenes de tampón de denaturación

(Formaldehído 30% v/v, Formamida 60% v/v y 10% v/v tampón MOPS 10X), se incubaron a 70°C por 10 minutos y luego 2 minutos en hielo. Se les agregó 5 µL de una solución de electroforesis 1:1 (Azul de Bromofenol 1% p/v, EDTA 1 mM, Glicerol 50 % v/v: Bromuro de Etidio 0,1 mg/ mL), para luego llevar a cabo la electroforesis durante 20 minutos a 100 voltios. La buena calidad del RNA total se visualizó cuando la banda superior de RNA ribosomal (RNAr) se ve aproximadamente el doble en intensidad que la banda de RNAr inferior.

2.8.3. Obtención de sondas radioactivas

Las sondas para marcaje radioactivo se sintetizaron mediante la técnica de PCR. Con los partidores de T7 y SP6 descritos en la sección 2.3, se amplificaron las secuencias de cada uno de los fragmentos de cDNA clonados en el plásmido pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega). Los productos de PCR fueron purificados con el sistema de purificación de productos de PCR "CONCERT" Matrix Gel Extraction System[®] de Gibco.

Para obtener las sondas cDNA marcadas con ³²P se utilizó el sistema "Hexalabel DNA Labeling" de Fermentas[®]. La mezcla de reacción consistió en 100 ng de producto de PCR purificado, solución de reacción que incluye los hexanucleótidos (Tris-HCl 0,25 M, MgCl₂ 25 mM, DTT 5 mM y "random-primer" 7,5 o.u./ mL), mezcla de dNTP (dGTP, dATP, dTTP 0,33 mM), 50 µCi de [α -³²P]-dCTP (Perkin Elmer) y 5 unidades de enzima Klenow (exo-). Se incubó a 37° por 30 minutos y después se eliminaron los dNTP no incorporados mediante cromatografía líquida sobre una

columna Sephadex G-50 (Amersham). La radioactividad fue cuantificada en un contador beta BECKMAN LS 5000TD.

La marcación con ^{32}P del RNAr 18S de *Arabidopsis* se hizo mediante la reacción de PCR utilizando el vector H8B10F7 y los partidores SK y KS del plásmido bluescript. En la reacción de PCR se utilizó DNA polimerasa Taq Fermentas (Vilnius, Lituania), en su correspondiente tampón, mezcla de nucleótidos 1,65 μM (dGTP, dATP y dTTP), MgCl 2,5 mM, y partidores 250 nM. La cantidad de templado utilizada fue de aproximadamente 100 pg (Mertz y Rashtchian). La temperatura de apareamiento y el tiempo de extensión utilizada para amplificaciones desde DNA plasmidial fue de 50°C por 75 segundos y 72°C por 1,5 minutos, respectivamente, y después se eliminaron los dNTP no incorporados mediante cromatografía líquida sobre una columna Sephadex G-50 (Amersham). La radioactividad fue cuantificada en un contador beta BECKMAN LS 5000TD.

2.8.4. Northern blot

Se realizó la transferencia de 20 μg de RNA total desde geles denaturantes de agarosa (descrito previamente en sección 2.8.2.2) a membranas de nylon Hybond-N+ (Amersham farmacia biotech) durante 16 horas, en solución de 10X SSC (NaCl 1,5 M y Citrato de Sodio 0,15 M) (Sambrook y col., 1989). Luego el RNA fue fijado a la membrana, exponiéndola a 1200 $\mu\text{joule}/\text{cm}^2$ durante 50 segundos.

El RNA unido a la membrana se incubó con una solución que contiene SSC 5X, Fosfato de Sodio 50 mM pH 6,8, Denhart 5X, SDS 1%, espermio de salmón 10

$\mu\text{g/mL}$ y EDTA 1 mM pH 8, durante 3 horas a 65°C. Luego se incubó durante toda la noche con la sonda correspondiente marcada radioactivamente con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$, en una solución que contenía SSC 5X, Fosfato de Sodio 50 mM pH 6,8, Denhart 5X, SDS 0,1%, espermio de salmón 10 $\mu\text{g/mL}$ y EDTA 1 mM pH 8. Para lavar las membranas, éstas se incubaron primero con SSC 5X/ SDS 0,1% a 65°C, durante 30 minutos. Posteriormente se incubaron 2 veces por 15 minutos con SSC 2X/ SDS 0,1% a 65°C y finalmente por 15 minutos con SSC 0,1X/ SDS 0,1% a 65°C.

La exposición de la membrana se realizó en una pantalla "Phospho Screen" (Bio-Rad, California, USA) y analizado en un equipo Molecular Imager FX (Bio-Rad, California, USA).

Con el fin de estandarizar los cambios en expresión, se estableció la razón del transcrito del gen en estudio (PpPG, PpPME ó PpExp) con el transcrito del gen ribosomal 18S (r18S) de durazno, un gen cuya abundancia relativa no cambia. El ensayo con el r18S de durazno, se realizó posterior al ensayo de northern blot con los genes en estudio y sobre la misma membrana (previo lavado de la membrana para eliminar la marca radioactiva anterior). Además este ensayo nos sirvió como una manera de saber la cantidad de RNA cargado de cada muestra sobre la membrana (control de carga). Una vez establecidas las razones de expresión de cada gen con su respectivo r18S, se asignó valor de 1 a aquella razón que fuera la más alta, y así al resto de las razones se le asignó un valor entre 0 y 1 respecto a la que presentó mayor valor de las razones de expresión.

2.9. Preparación proteínas para PG

2.9.1. Extracción de proteínas para ensayos actividad de PG

El método se basa en lo descrito por Zhou y col. (2000b). Dos gramos de mesocarpio de durazno congelado de las variedades Fancy Lady y O'Henry, se molieron en 4 mL de PEG 3350 12% y bisulfito de sodio 0,2%, durante 2 minutos. Se centrifugaron a 10.500g durante 10 minutos y el pellet obtenido se lavó con 0,2% bisulfito de sodio. Luego se incubó con Acetato de Sodio 50 mM pH 5 y NaCl 0,5 M frío con agitación constante a 4°C, durante 90 minutos y posteriormente se centrifugó a 10.500g por 10 minutos. El sobrenadante obtenido se ocupó como el extracto crudo (Pressey y Avants, 1973; Zhou y col., 2000b).

2.9.2. Ensayo de actividad para PG

A 4 mL de Ácido Poligalacturónico 2% preparado en AcNa 50 mM pH 4,4 (sustrato), se le agregó 2 mL del extracto enzimático crudo. La mezcla fue incubada durante 4 horas en un baño a 30°C.

Se midió la viscosidad de las mezclas en un viscosímetro tipo Ostwald, tanto al inicio (vi) como al final (vf) del período de incubación. Los ensayos se hicieron con tres muestras biológicas (fruto) y en duplicado para cada condición de almacenamiento.

Una Unidad de Actividad se define como:

$$U \text{ actividad específica} = \frac{(\text{viscosidad inicial} - \text{viscosidad final})}{\text{Viscosidad del agua} / \text{mg proteína} / \text{hora}}$$

Se hicieron ensayos previos para determinar el tiempo de incubación a 30°C, sobre el sustrato ácido poligalacturónico no esterificado 2%, ocupando un extracto

enzimático comercial de pectinasas de Sigma a distintas concentraciones (dato no mostrado).

2.10. Ensayo de actividad PME

2.10.1. Extracción de proteínas para ensayos actividad de PME

Un gramo de mesocarpio de *Prunus persica* de las variedades Fancy Lady y O'Henry congelados previamente en nitrógeno líquido fue homogenizado en frío con NaCl 1 M y PVPP 1%, pH 7,5, sobre un mortero previamente enfriado. El homogenizado fue centrifugado a 14.000g por 30 minutos. El sobrenadante fue separado y ajustado a pH 7,5 con NaOH, para luego ensayar la actividad de PME (modificado de A. Hagerman y P. Austin, 1986).

2.10.2. Ensayo de actividad para PME

El método se basa en lo descrito por A. Hagerman y P. Austin en 1986. Para iniciar con un pH constante la reacción, todas las soluciones (pectina, agua, indicador) fueron ajustadas a pH 7,5 con NaOH 2 M justo antes de cada ensayo.

Solución de pectina de cítrico 0,5% (p/v) (Sigma), fue preparada en agua destilada, calentando la mezcla mientras se agitaba constantemente. La solución de azul de bromotimol 0,01% (p/v) fue preparada en tampón de Fosfato de potasio 0,003 M pH 7,5.

El ensayo fue medido a 620 nm en espectro Lambda EZ201 Perkin Elmer™. En una cubeta, 1 mL de la mezcla pectina/ azul de bromotimol (0,075 mL de azul de bromotimol por cada mL de pectina) y 0,4 mL del extracto enzimático, fue mezclado y

medida la absorbancia a 620 nm (A_{620}) durante 3 minutos, ocupando agua como blanco. La absorbancia inicial a 620 nm, permaneció constante mientras no se agregó el extracto enzimático. Se realizaron curvas de calibración con ácido galacturónico (Sigma), además, se realizaron los blancos del ensayo reemplazando con agua el extracto enzimático y el sustrato, observando que no existían cambios en el indicador de pH (azul de bromotimol). Todos los ensayos se hicieron en tres muestras biológicas (fruto) y en duplicado.

Una unidad de actividad se define como:

$$U \text{ actividad específica} = \frac{\mu\text{moles de ácido galacturónico}}{(\text{mg proteínas totales}) (3 \text{ min.})}$$

2.11. Análisis de Western blot para el gen de Expansina de *Prunus persica*

2.11.1. Extracción de proteínas para análisis de Western blot

A un gramo de mesocarpio de durazno molido en nitrógeno líquido se agregó 4 mL de la solución de extracción (Sacarosa 0,7 M, Tris-HCl 0,05 M pH 7,8, EDTA 0,005 M, KCl 0,1 M, HCl 0,03 M, DTT 0,002 M y PMSF 0,002 M en isopropanol) y 4 mL de Fenol (en Tris pH 8). Se agitó utilizando vortex por 5 minutos y se centrifugó a 8000g por 14 minutos. Se retiró la fase fenólica (superior) y se transfirió a un nuevo tubo. Luego se agregaron 5 volúmenes de acetato de amonio 0,1 M disuelto en metanol, se mezcló bien y se dejó a -20°C por 16 horas, para posteriormente centrifugarlo a 8000g por 14 minutos, desechando el sobrenadante. Al pellet formado se agregó una solución de acetato de amonio 0,1 M disuelto en metanol, se agitó en vortex hasta disolver el precipitado. Se volvió a precipitar a -20°C durante 15 minutos y se centrifugó a 8000g por 6 minutos. Para disolver el precipitado se agregó una solución de acetona al 80%

fría agitando, para luego repetir las condiciones de precipitación y centrifugación descritas anteriormente. El pellet se secó por 15 minutos a 37°C y por 30 minutos a temperatura ambiente, para luego disolverlo con 150 µL de solución de corrida (Urea 8 M, CHAPS 4% y Anfolitos 0,2%). Se dejó a 30°C por 30 minutos y centrifugó a 7000g por 10 minutos a temperatura ambiente colectando el sobrenadante. El extracto de proteínas se guardó a -70°C (protocolo modificado de Holford y col., 2002).

2.11.2. Separación de proteínas en electroforesis de geles denaturantes SDS-PAGE

Una alícuota de las muestras de proteínas se cargaron en un gel de Poliacrilamida (PAGE) al 15% en condiciones denaturantes (SDS-PAGE: Gel separador; 15% de Poliacrilamida, 25% Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,001%, PSA 0,001% y TEMED 0,0001%, Gel concentrador; 3% de Poliacrilamida, 25% Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,001%, PSA 0,001% y TEMED 0,0001%). La electroforesis fue llevada a cabo en tampón de corrida (Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1%) durante 90 minutos a 90 Voltios.

2.11.3. Transferencia de proteínas desde gel poliacrilamida a membrana de nitrocelulosa.

Se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida 15% a una membrana de Nitrocelulosa de 0,2 micrones (Sigma-Aldrich) a 300 mA por 1 hora en condiciones de frío, en tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,01% y Metanol 20%)(Bollag y Edelstein, 1991).

2.11.4. Western blot Expansina

Treinta microgramos de proteínas totales de durazno se sometieron a SDS-PAGE (descrito en punto 2.11.2). Las proteínas desde el gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (SIGMA-ALDRICH). Luego de la transferencia, la membrana se bloqueó en una solución que contiene 5% de leche descremada (Svelty, Nestle®) en PBS-Tween 0,1% durante 16 horas a 4°C, luego se incubó con el anticuerpo anti Expansina 1 de tomate (LeExp1), en una dilución de 1:2000 en PBS-Tween 0,05% y de leche descremada 0.4%, durante 3 horas a temperatura ambiente. Como anticuerpo secundario se utilizó anti Ig-G de conejo acoplado a peroxidasa Horseradish (HRP) (SIGMA). Después de cada incubación se hicieron lavados consecutivos con PBS-Tween 0,1% en constante agitación. La identificación de la peroxidasa se realizó mediante ensayo con Luminol 250 mM (3-aminophtalhidrazida, Fluka) y Ácido cumárico 90 mM (Sigma) (ambas preparadas en DMSO) en tampón Tris 100 mM pH 8,5. A esta solución se agregaron 3 µL de peróxido de hidrógeno, justo antes de incubar la membrana, durante 30 segundos.

La exposición de las membranas en placas auto-radiográficas Full Blue (Fermelo), se realizó durante 5 minutos y luego fueron reveladas en un equipo de revelado AGFA Curix60 (AGFA-Gevaert, Alemania).

RESULTADOS

3.1. Susceptibilidad varietal al daño por frío.

Un número de muestra de 10 frutos para cada condición de almacenamiento, fue evaluada en su firmeza ecuatorial, su contenido de jugo y harinosidad. La evaluación para las variedades se realizó a la cosecha (Cos), y luego de un período de almacenamiento de 15 y 30 días en una cámara de frío a 0°C (F15 y F30 respectivamente). Posteriormente, se evaluaron los mismos parámetros a los frutos llevados a la cámara de maduración después de su almacenamiento en frío (CosM, 15M y 30M), usando como criterio de maduración la resistencia de la pulpa a la presión (8,9- 17,8 N).

La Tabla 1 muestra los datos obtenidos, como promedio, de la firmeza ecuatorial y el principal desorden fisiológico limitante (harinosidad, pardeamiento y coloración rojiza) que afecta a las variedades de duraznos y nectarines evaluados.

Tabla 1: Principales desórdenes fisiológicos y duración máxima en almacenaje refrigerado (0°C) en distintas variedades de duraznos y nectarinos.

Variedad	Fecha cosecha	Firmeza ecuatorial a la cosecha (N)	Principal desorden fisiológico (limitante)			% Frutos harinosos (después de 30 días almacenado)
			H	P	CR	
DURAZNOS						
Fancy Lady	22 Dic.	48,9-53,4	X			10
O'Henry	25 Ene.	48,9-53,4	X			100
Early Elegant Lady	8 Ene.	44,5-53,4	X	X		100
Summer Lady	28 Ene.	44,5-53,4	X	X		0
Red Nos	25 Feb.	44,5-53,4	X	X		50
Sweet September	25 Feb.	44,5-53,4	X	X		100
NECTARINOS						
Jim Red	11 Feb.	44,5-53,4	X	X	X	100
C-17	16 Feb.	44,5-53,4	X	X		100

La evaluación de la firmeza ecuatorial, % de frutos harinosos, desorden fisiológico que afecta a la variedad (**H**: Harinosidad, **P**: Pardeamiento y **CR**: Coloración rojiza), fueron determinados como se describe en Materiales y Métodos (Sección 2.6).

Luego de evaluar cada variedad proveniente de las temporadas 2002/03 y 2003/04, se decidió realizar los estudios de expresión génica y actividad enzimática de Poligalacturonasa (PG), Pectina Metilesterasa (PME) y Expansina (Exp), en las variedades Fancy Lady (DFL) y O'Henry (DOH), ya que ambas presentaron como principal desorden fisiológico la harinosidad de su pulpa, además, son ejemplos de la susceptibilidad a bajas temperaturas que exhiben distintas variedades, ya que presentan una diferencia en el porcentaje de frutos que se tornan harinosos después de 30 días de almacenamiento a 0°C, siendo para Fancy Lady el 10% de los frutos evaluados y para O'Henry del 100% de los frutos evaluados.

3.2. Cantidad de jugo extraíble para las variedades Fancy Lady y O'Henry.

De los frutos obtenidos para cada condición de almacenamiento se les extrajo su contenido de jugo como se describe en materiales y métodos (Sección 2.6.2). En la Figura 1 se muestra los porcentajes de jugo extraíble para Fancy Lady y O'Henry, se puede observar en ambos gráficos que a medida que aumenta el tiempo de almacenaje el porcentaje de jugo extraíble va disminuyendo, siendo menor en aquellos frutos que presentan harinosidad (30MH). En la figura se indica sobre las barras de 30MS y 30MH de cada variedad, el porcentaje de frutos que representan la condición descrita, apreciándose que la var. Fancy Lady después de 30 días de almacenamiento, presenta un mayor porcentaje de frutos jugosos (60%), que la var. O'Henry (10%), indicando que en estas condiciones O'Henry fue más susceptible a la exposición a 0°C que Fancy Lady.

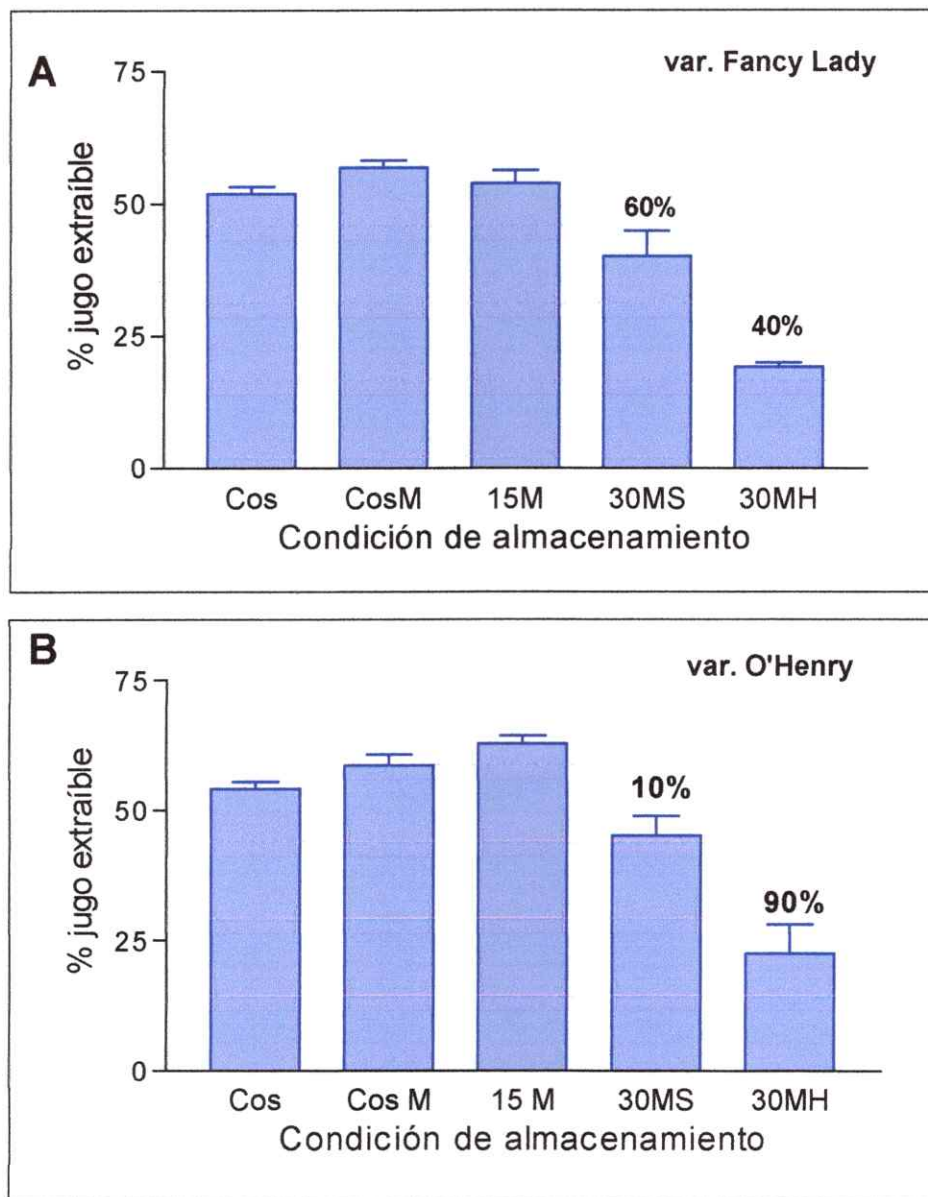


Figura 1: **Porcentaje de jugo extraíble de las variedades DFL y DOH.** En **A**: var. Fancy Lady y en **B**: var. O'Henry. Se representa el promedio de la cantidad de jugo extraíble en cada condición de almacenamiento ($n = 10$, para cada condición evaluada; Sección 2.6.2 Materiales y Métodos). Cos: Cosecha, CosM: Cosecha Maduro, 15M: 15 días almacenaje Maduro, 30MS: 30 días almacenaje Maduro "Sano", 30MH: 30 días almacenaje Maduro Harinoso.

3.3. Obtención de cDNA parciales de los genes de PG, PME y EXP.

Durante el almacenamiento por períodos prolongados a baja temperatura, la fruta sufre cambios físicos y fisiológicos percibidos principalmente en el mesocarpio (pulpa), en forma de texturas secas y harinosas, pardeamiento y otros síntomas descritos como coloración rojiza, descomposición interna, entre otros. En la literatura se ha planteado que algunos de estos cambios, particularmente los que tienen que ver con textura y harinosidad, estarían relacionados con cambios en la pared celular (Von Mollendorff y De Villiers, 1988; Obeland y Carrol 2000; Zhou y col., 2000a y b). De esta forma, decidimos evaluar si los genes involucrados en la modificación de la arquitectura de polisacáridos de la pared celular, como PG, PME y Exp sufren cambios en su expresión durante el almacenamiento de los frutos a bajas temperaturas. Para ello se obtuvieron los cDNA parciales de estos genes utilizando partidores de DNA que se generaron con la información disponible en las bases de datos de GeneBank (para PG: Glover y col., 1996) y la Universidad de Clemson, USA. Los partidores se utilizaron para amplificar mediante RT-PCR los fragmentos de cDNA parciales de los genes de PpPG, PpPME y PpExp.

En la Figura 2 se observan los productos de la amplificación obtenida mediante RT-PCR para los tres genes. Para el gen de PpPG se obtuvo un fragmento de DNA de aproximadamente 486 pb. Este gen fue clonado en el vector pGEM-T (Promega, USA) y posteriormente secuenciado. Para el gen de PpPME(1) se obtuvo un cDNA parcial de aproximadamente 575 pb, sin embargo, no fue posible clonar este cDNA, por lo que en ensayos posteriores se utilizó un cDNA parcial (486pb) obtenido en el Lab. de Genética Molecular Vegetal por Andrea Morales, Ing. Biotec. Mol. a cargo de la Dra. Lee Meisel

(PpPME(2)). Finalmente, la amplificación del cDNA parcial para Expansina de *P. persica*, generó un fragmento de aproximadamente 540 pb, este fragmento fue clonado en el vector pGEM-T (Promega, USA) y luego secuenciado.

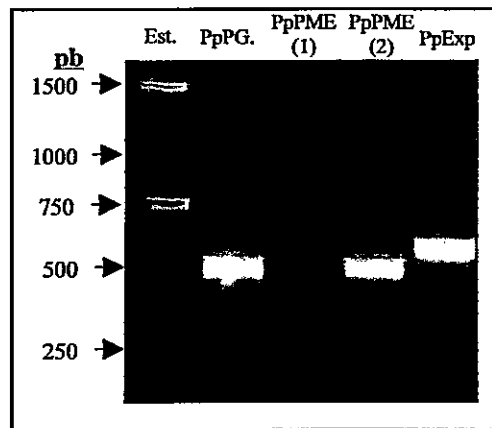


Figura 2: **Amplificación cDNA parcial.** Cada uno de los cDNAs parciales fue amplificado como se describe en la Sección 2.7.5 de Materiales y Métodos. Los productos de la amplificación del RT-PCR fueron separados utilizando un gel de agarosa al 1%. Carril 1.- Estándar Peso Molecular 1Kb Fermentas 2.- cDNA parcial PpPG 3.- cDNA parcial PpPME(1) 4.- cDNA parcial PpPME(2) 5.- cDNA parcial PpExp.

Análisis de las secuencias para los genes de PpPG, PpExp y PME se muestran en la Figura 3. La alineación del fragmento secuenciado del gen de PpPG muestra homología con el gen de endo-Poligalacturonasa 1 de *Prunus persica* (Nº acceso NCBI AF095577) (Figura 3A), con un 99% de identidad. De la misma manera, en la figura 3B, el análisis para el fragmento de Expansina secuenciado, muestra homología con el gen Expansina 1 de *Prunus persica*, con 100% de identidad (Nº acceso NCBI AB029083). Además, esta secuencia muestra un 99% de identidad con la secuencia que codifica para el gen de Expansina 2 de *Prunus armeniaca*

(damasco), otro integrante de la familia de los carozos (dato no mostrado). En la figura 3C se muestra el alineamiento para el cDNA parcial del gen PME obtenido por A. Morales, el cual tiene homología con el gen de la Pectina Metilesterasa de *Prunus persica* (Nº acceso NCBI X95991).

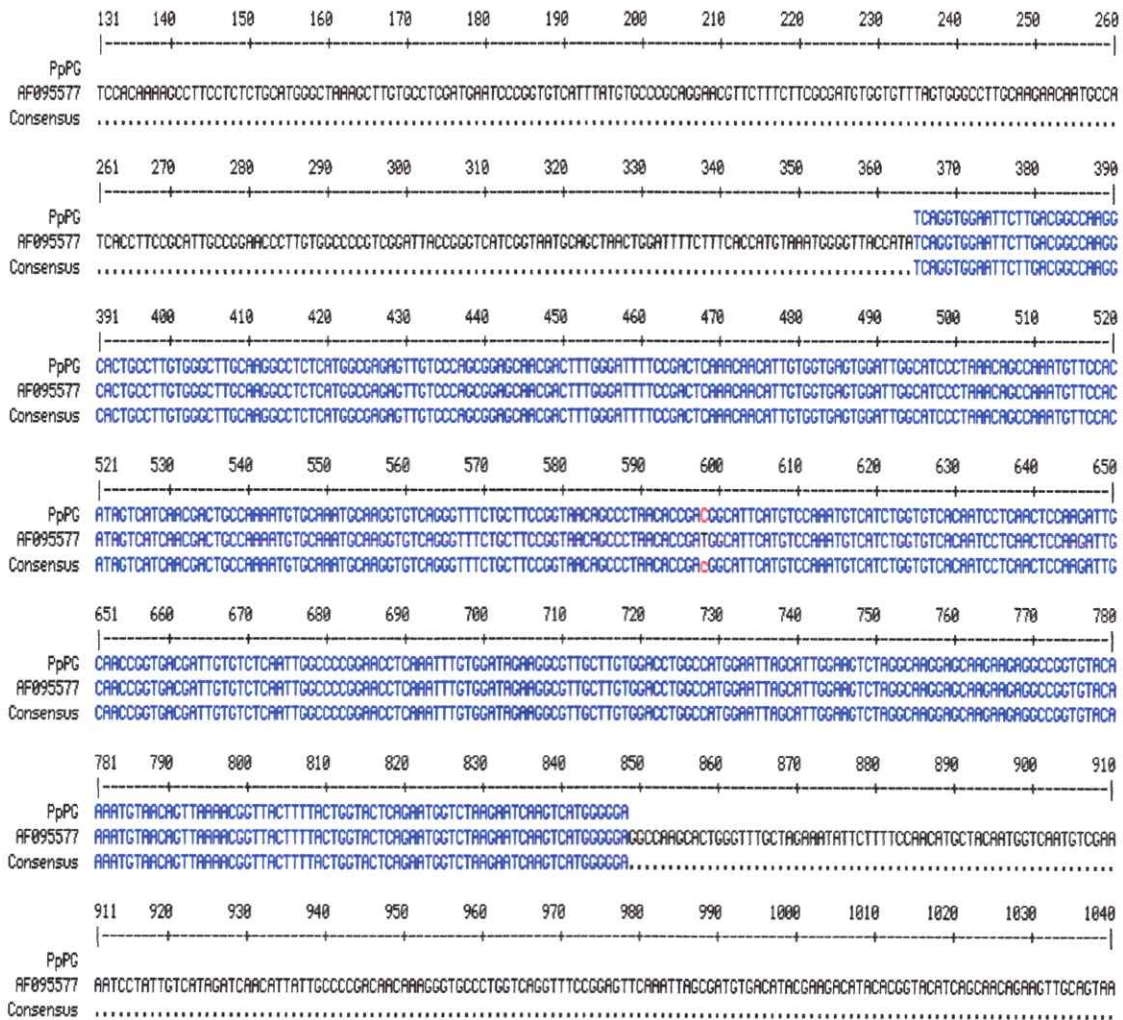


Figura 3A: Alineamiento de cDNA parcial de PpPG. Alineamiento del cDNA parcial de PpPG con secuencia de endo-PG de *Prunus persica* (Nº acceso NCBI AF095577). En letras azules, se muestra la secuencia idéntica, en letra roja, nucleótidos no idénticos.

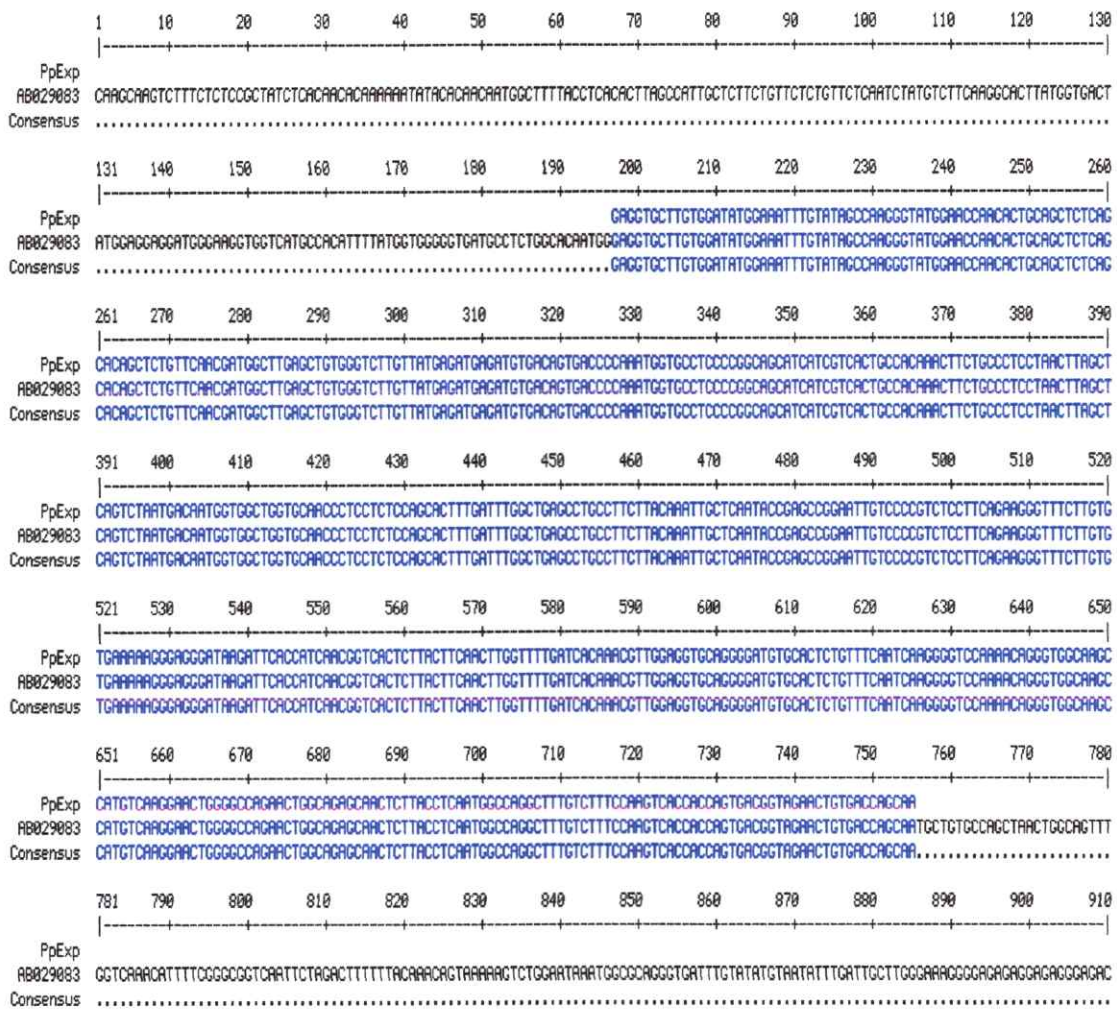


Figura 3B: Alineamiento de cDNA parcial de PpExp. Alineamiento del cDNA parcial de PpExp con secuencia de Expansina de *Prunus persica* (N° acceso NCBI AB029083). En letras azules, se muestra la secuencia idéntica.

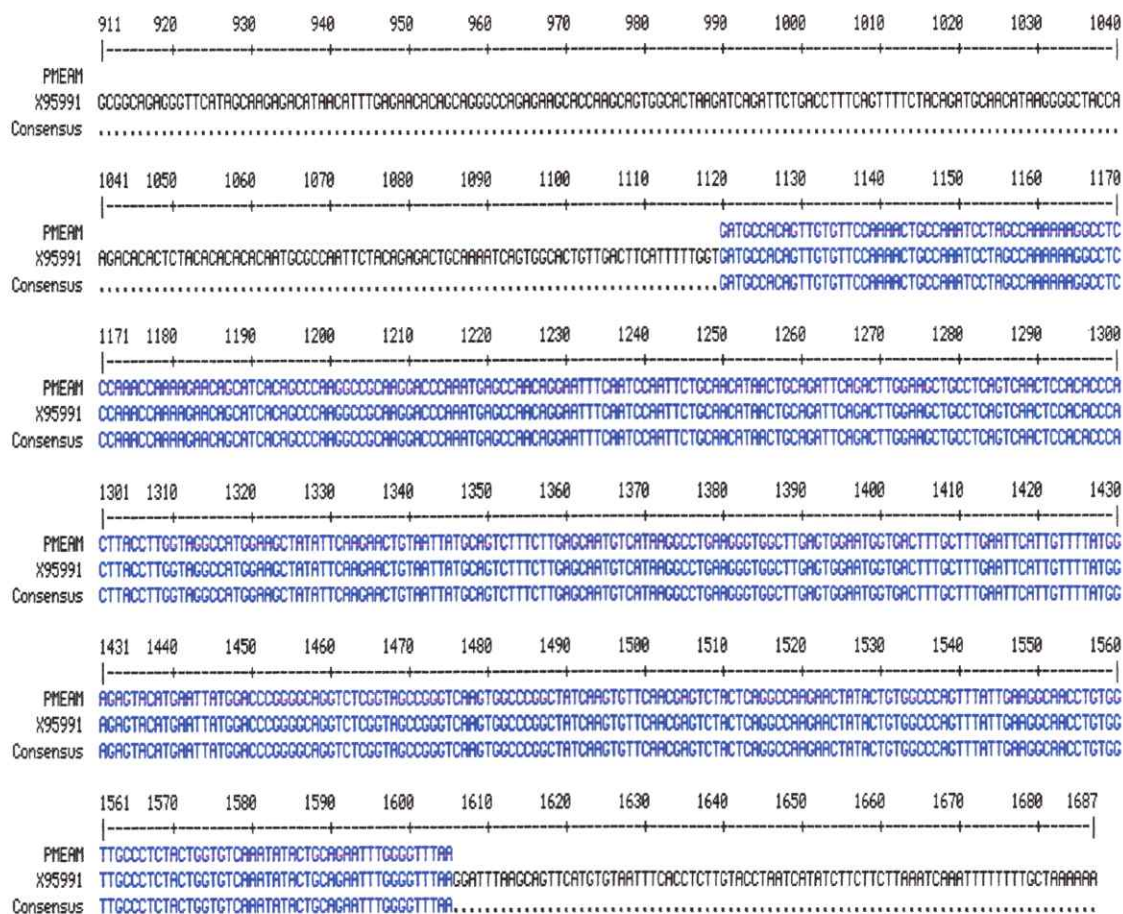


Figura 3C: Alineamiento de cDNA parcial de PME. Alineamiento del cDNA parcial de PME (secuencia de A. Morales) con secuencia de Pectina esterasa de *Prunus persica* (Nº acceso NCBI X95991). En letras azules, se muestra la secuencia idéntica.

3.4. Análisis del patrón de expresión y de las actividades enzimáticas y proteína para los genes Poligalacturonasa, Pectina Metilesterasa y Expansina de *Prunus persica*, respectivamente.

El análisis de los cambios en la expresión génica de PG, PME y Exp, junto con la determinación de la actividad enzimática de PG y PME, más la acumulación de Exp, se realizó en las variedades de duraznos Fancy Lady (DFL) y O'Henry (DOH). Los resultados analizados para cada gen, son representativos de un conjunto de 3 repeticiones realizadas.

3.4.1. Análisis de expresión génica del gen de Poligalacturonasa de *Prunus pérsica* (PpPG) durante la postcosecha en las variedades de duraznos Fancy Lady y O'Henry.

El análisis por Northern blot, utilizando como sonda el cDNA parcial del gen de PG de *Prunus persica* y en condiciones de alta estrictez en las hibridaciones, nos permitieron identificar un único transcrito que posee un tamaño aproximado de 1920 pb (Fig. 4). Este transcrito fue difícilmente visible en el estadio "cosecha" en los duraznos Fancy Lady, mientras que en los duraznos O'Henry se pudo apreciar con mayor claridad. En frutos maduros de ambas variedades, se observó un significativo incremento en el contenido del transcrito. Con el fin de estandarizar los cambios en expresión, se estableció la razón del transcrito del gen de PG con el transcrito del gen ribosomal 18S (r18S), un gen cuya abundancia relativa no cambia, pudiendo apreciar que el cambio en la acumulación del transcrito del gen PG al ocurrir la maduración fue mayor en Fancy Lady que en O'Henry (Fig. 4C y D).

Al analizar los duraznos sometidos a 15 días de almacenamiento a 0°C, se observó que el transcrito de PG estuvo ausente tanto en el durazno Fancy Lady como O'Henry. Después de 30 días de almacenamiento a 0°C.(F30) el transcrito de PG no fue visible en el durazno O'Henry, sin embargo, en el durazno Fancy Lady fue posible observar la presencia del transcrito de PG. El análisis de la presencia del transcrito de PG en duraznos maduros almacenados en frío mostró que se produjo un incremento en el contenido del transcrito de PG. En los duraznos Fancy Lady se detectó un alto contenido de este transcrito en los frutos maduros después de 15 días de almacenamiento a 0°C. De hecho, fue el estadio de postcosecha que presentó el mayor contenido de este transcrito en el durazno Fancy Lady. Al analizar el contenido del transcrito de PG en los duraznos maduros después de 30 días de almacenamiento en frío (30M), observamos que el transcrito estaba presente en una cantidad similar a la presente en frutos maduros directamente de la cosecha (CosM), sin embargo, el contenido del transcrito de PG fue inferior al observado en frutos maduros almacenados por 15 días en frío (15M). En duraznos O'Henry observamos que los frutos maduros después de estar almacenados por 15 o 30 días a 0°C (15M y 30M) también presentaban un importante nivel de expresión del gen PG, sin embargo, en este caso hubo un mayor incremento en los duraznos maduros después de 30 días en frío (30M), mientras que los duraznos maduros después de 15 días en frío (15M) presentaban un nivel similar al de duraznos maduros después de la cosecha (CosM).

Al comparar duraznos maduros almacenados por 30 días a 0°C distinguiendo entre aquellos que presentaban harinosidad (30MH) de aquellos que no la presentaban

(30MS), observamos que no existían diferencias entre el contenido de los transcritos presentes en duraznos Fancy Lady y O'Henry.

3

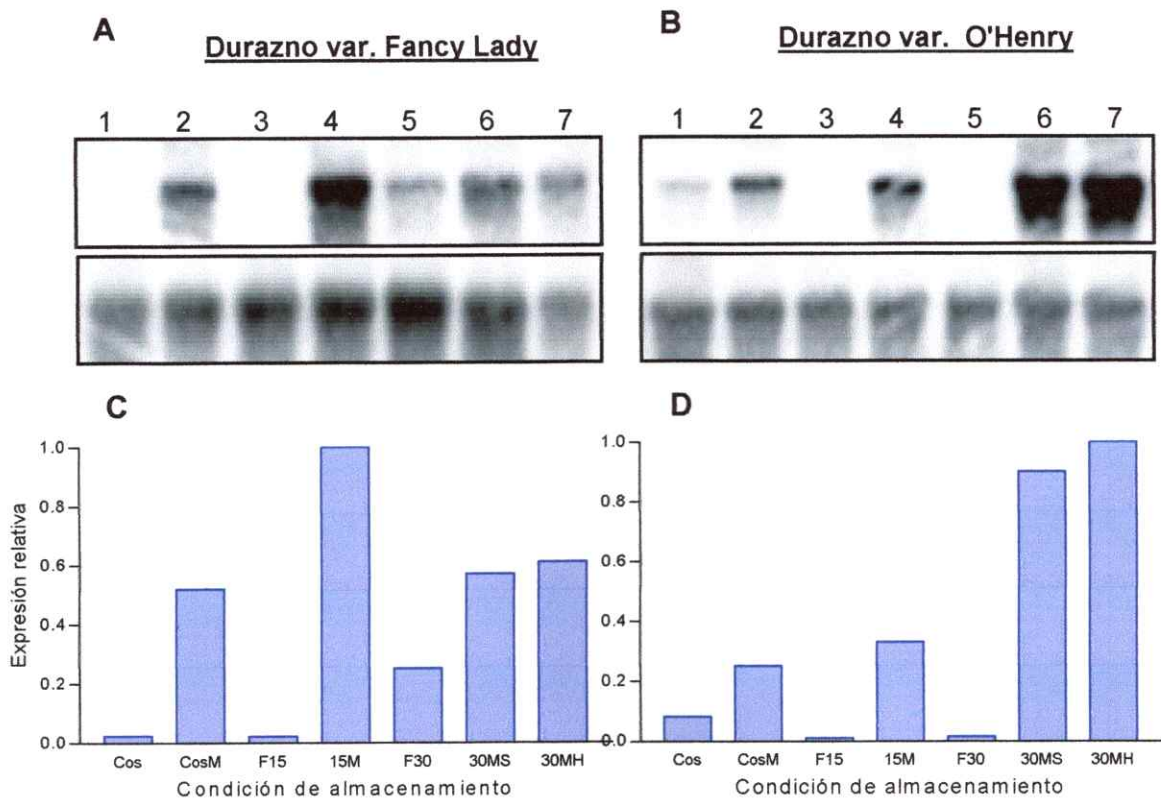


Figura 4: Análisis de expresión génica del gen PpPG de *Prunus persica*. **A:** var. Fancy Lady **B:** var. O'Henry. Panel superior: Análisis de Northern blot para el gen PpPG. Panel inferior: Análisis de Northern blot para el gen r18S de *Prunus persica*, como control de carga. **C y D:** Expresión relativa del gen de PpPG calculada a partir del estadio que presenta mayor expresión (Sección 2.8.4 Materiales y Métodos) para DFL y DOH, respectivamente. 1.-Cosecha (Cos) 2.-Cosecha Maduro (CosM) 3.-15 días almacenaje en frío (F15) 4.-15 días almacenaje Maduro (15M) 5.- 30 días almacenaje en frío (F30) 6.-30 días almacenaje Maduro "Sano" (30MS) 7.-30 días almacenaje Maduro Harinoso (30MH).

3.4.2. Análisis de actividad enzimática del gen de PpPG durante la postcosecha en variedades de duraznos Fancy Lady y O'Henry.

Los resultados obtenidos en la medición de actividad de PG (Fig. 5), indican que ambas variedades de duraznos experimentaron un incremento de 2-3 veces en la actividad de esta enzima cuando los frutos pasaron del momento de la cosecha (Cos) al estadio maduro (CosM). La actividad de esta enzima en frutos almacenados en frío por 15 días (F15) fue similar a la observada en los frutos a la cosecha (Cos). A los 30 días de almacenamiento (F30) hubo un pequeño incremento en la variedad Fancy Lady, mientras que en O'Henry la actividad PG se mantuvo en niveles similares a los observados en frutos almacenados por 15 días en frío (F15). Los frutos maduros obtenidos a partir de aquellos que estuvieron almacenados por 15 días a 0°C (15M) mostraron una alta actividad de PG, siendo superior a la de los frutos maduros provenientes directamente de la cosecha (CosM). Esta fue la mayor actividad detectada para los distintos estadios de postcosecha evaluados.

La evaluación de la actividad de PG determinada en frutos maduros después de ser almacenados por 30 días a 0°C (30M), se realizó separadamente para aquella fracción de frutos que contenían jugo y los que se encontraban harinosos (ver figura 1). En la variedad DFL la actividad PG fue mayor en los duraznos que presentaban jugo (30MS) que en aquellos harinosos (30MH), mientras que en la var. DOH la actividad PG de los frutos harinosos (30MH) no fue estadísticamente diferente a los frutos jugosos de DOH (30MS).

Las figuras 6 y 7 muestran un resumen de las actividades enzimáticas y la respectiva expresión relativa para Poligalacturonasa en cada una de las condiciones estudiadas para las variedades Fancy Lady y O'Henry.

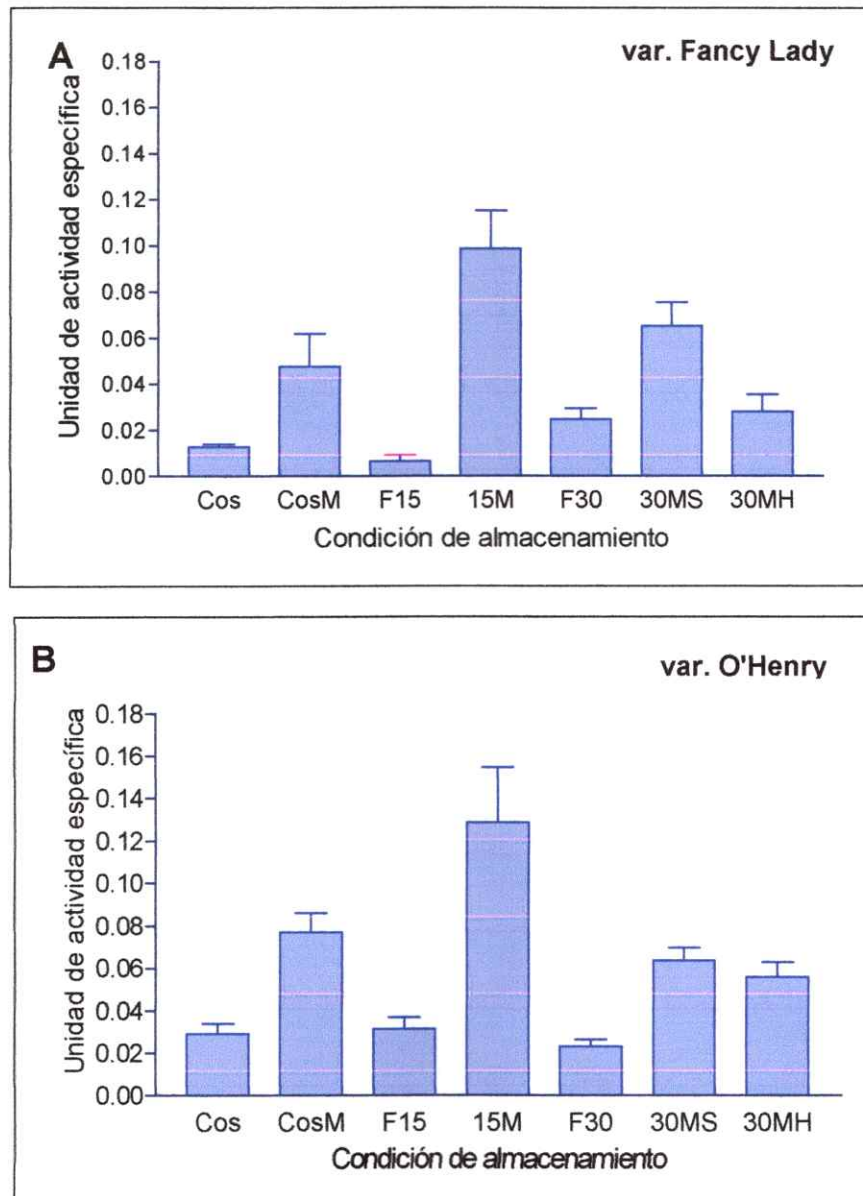


Figura 5. Análisis de la actividad enzimática para el gen PpPG de *Prunus persica*. **A:** var. Fancy Lady **B:** var. O'Henry. Actividad relativa donde una Unidad de actividad = (viscosidad inicial- viscosidad final)/ (Viscosidad del agua / mg proteína / hora). Cos: Cosecha, CosM: Cosecha Maduro, F15: 15 días almacenaje, 15M: 15 días almacenaje Maduro, F30: 30 días almacenaje, 30MS: 30 días almacenaje Maduro "Sano" y 30MH: 30 días almacenaje Maduro Harinoso.

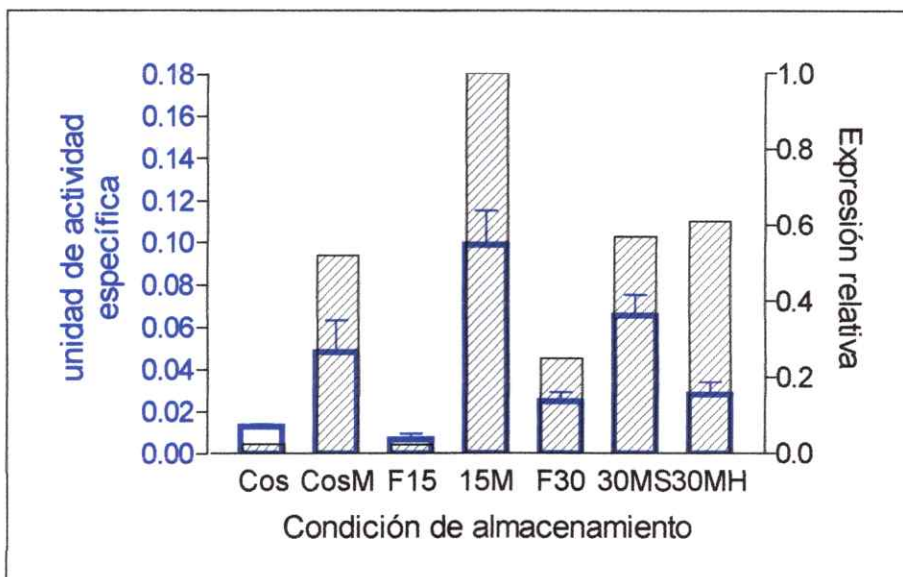


Figura 6: Resumen de la expresión y actividad enzimática de PG para la var. Fancy Lady. Las barras vacías con contorno azul representan la actividad específica de PG. En barras negras achuradas representan la expresión relativa del gen de PpPG.

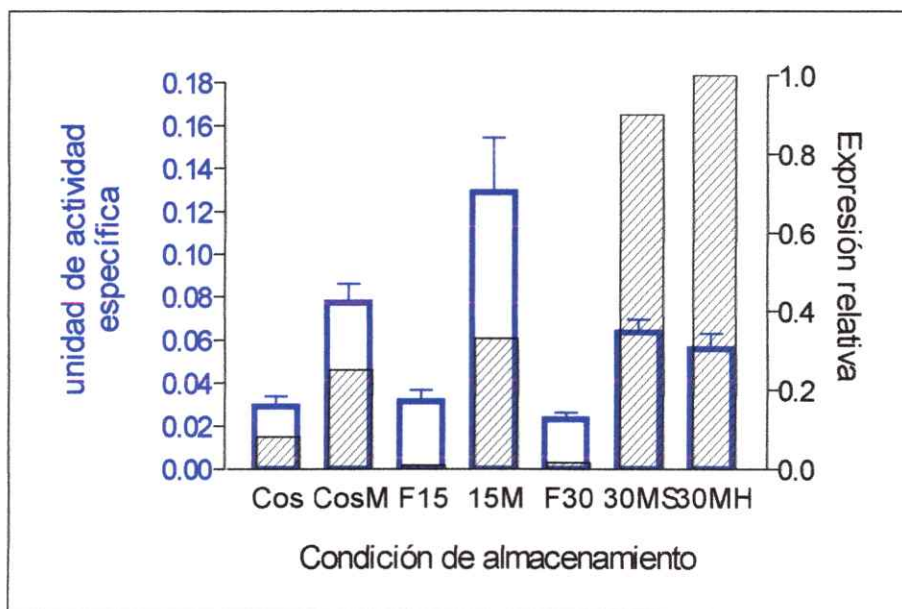


Figura 7: Resumen de la expresión y actividad enzimática de PG para la var. O'Henry. Las barras vacías con contorno azul representan la actividad específica de PG. En barras negras achuradas representan la expresión relativa del gen de PpPG.

3.4.3. Análisis de expresión génica para el gen de Pectina metilesterasa de *Prunus pérsica* (PpPME) durante la postcosecha, en variedades de duraznos Fancy Lady y O'Henry.

El análisis de expresión del gen PpPME, se realizó utilizando como sonda el cDNA parcial del gen de *Prunus persica*. Las condiciones de alta estrictez en la hibridación nos permitió observar un solo transcrito de un tamaño aproximado de 1,9 Kb (Fig. 8). Este transcrito apareció en todas las condiciones de almacenamiento estudiadas, tanto para los duraznos Fancy Lady como O'Henry. En ambas variedades se observó el mayor nivel de acumulación del transcrito de PpPME en el estadio cosecha. La cantidad de transcrito observado disminuyó en el fruto maduro (CosM), situación que fue más acentuada en la variedad Fancy Lady que en la variedad O'Henry. Luego de un período de almacenamiento en frío de 15 días, en DFL se observó un aumento en el nivel del transcrito, el cual se mantuvo cuando el fruto maduró (15M). En cambio para DOH, después de 15 días de almacenamiento a 0°C (F15), la cantidad de transcrito de PME alcanzó su nivel más bajo, sin desaparecer. En el fruto maduro después de 15 días almacenado a 0°C (15M) se observó un aumento en el transcrito alcanzando niveles comparables a los duraznos que maduraron después de la cosecha (CosM). Frutos de ambas variedades almacenados por 30 días a 0°C (F30) mostraron niveles del transcrito de PME al menos 5 veces menores a los observados en frutos provenientes del estadio cosecha. Sin embargo, cuando se analizó el nivel del transcrito de PME en los frutos que maduraron después de 30 días a 0°C (30M), en la variedad DFL no se observó un aumento en el transcrito, tanto en la fracción de frutos jugosos (30MS) como en la de frutos harinosos (30MH), mientras que en la variedad DOH, se observó un aumento del transcrito en los frutos maduros

después de 30 días de almacenamiento. Sin embargo, en ésta condición de postcosecha el contenido del transcrito de PME fue mayor en la porción de frutos harinosos que en los jugosos, y alcanzó niveles similares a los observados en los frutos maduros provenientes de la cosecha (CosM).

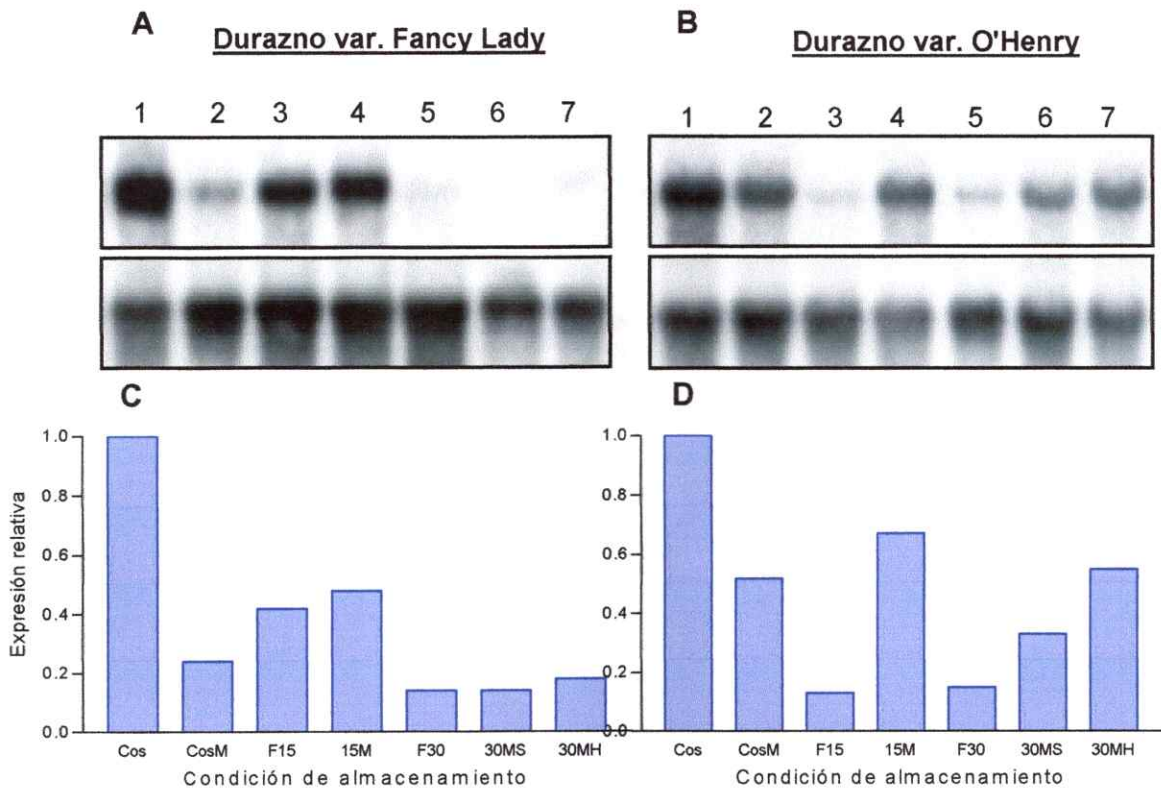


Figura 8: Análisis de expresión génica para el gen PpPME de *Prunus persica*. A: var. Fancy Lady **B:** var. O'Henry. Panel superior: Análisis de Northern blot para el gen PpPME. Panel inferior: Análisis de Northern blot para el gen *r18S* de *Prunus persica*, como control de carga. Paneles: 1.-Cosecha (Cos); 2.-Cosecha Maduro (CosM); 3.-15 días almacenaje en frío (F15); 4.-15 días almacenaje Maduro (15M); 5.-30 días almacenaje en frío (F30); 6.-30 días almacenaje Maduro Sano (30MS); 7.-30 días almacenaje Maduro Harinoso (30MH). C y D: Expresión relativa del gen PpPME calculada a partir del estadio que presenta mayor expresión (Sección 2.8.4 Materiales y Métodos) para DFL y DOH, respectivamente.

3.4.4. Análisis de la actividad enzimática de PME durante la postcosecha, en variedades de duraznos Fancy Lady y O'Henry.

La medición de la actividad de PME (Fig. 9), nos mostró que la actividad mas alta se detectó en los primeros estadíos de la fruta, es decir, cuando la fruta fue cosechada y luego se le permitió madurar. En estos dos estadíos no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la actividad de PME en los duraznos Fancy Lady y O'Henry. Luego de 15 días de almacenamiento a 0°C (F15), los frutos de la variedad DFL disminuyeron su actividad enzimática alrededor de 5 veces, mientras que en la variedad DOH esta disminución solo fue de alrededor de un 30%. Los frutos maduros obtenidos a partir del estadío de postcosecha de 15 días de almacenamiento (15M) incrementaron su actividad enzimática a niveles comparables con los niveles observados en frutos maduros provenientes directamente de la cosecha (CosM). En los duraznos Fancy Lady esta enzima mostró una disminución en la actividad luego de un período de almacenamiento de 30 días en frío; sin embargo, la actividad fue mayor que aquella detectada en la fruta que se almacenó por 15 días. Este nivel de actividad se mantuvo en los frutos maduros que pasaron 30 días almacenados a 0°C (30M), tanto en la porción de frutos maduros jugosos (30MS) como en los harinosos (30MH); sin embargo, en la fracción de frutos jugosos se observó una tendencia a encontrar una mayor actividad de PME. En la variedad DOH la actividad de PME disminuyó en los frutos almacenados por 30 días a 0°C, y al igual que en DFL, los frutos maduros provenientes de ésta condición de almacenamiento no presentaron un aumento en la actividad, no existiendo una diferencia estadísticamente significativa en la actividad de PME al comparar los frutos jugosos y harinosos.

En un escenario general, se observó que la actividad de PME siempre estuvo presente y fue disminuyendo a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento de los duraznos a bajas temperaturas.

Las figuras 10 y 11 muestran un resumen de las actividades enzimáticas y la respectiva expresión relativa para la Pectina metilesterasa en cada una de las condiciones estudiadas para las variedades Fancy Lady y O'Henry.

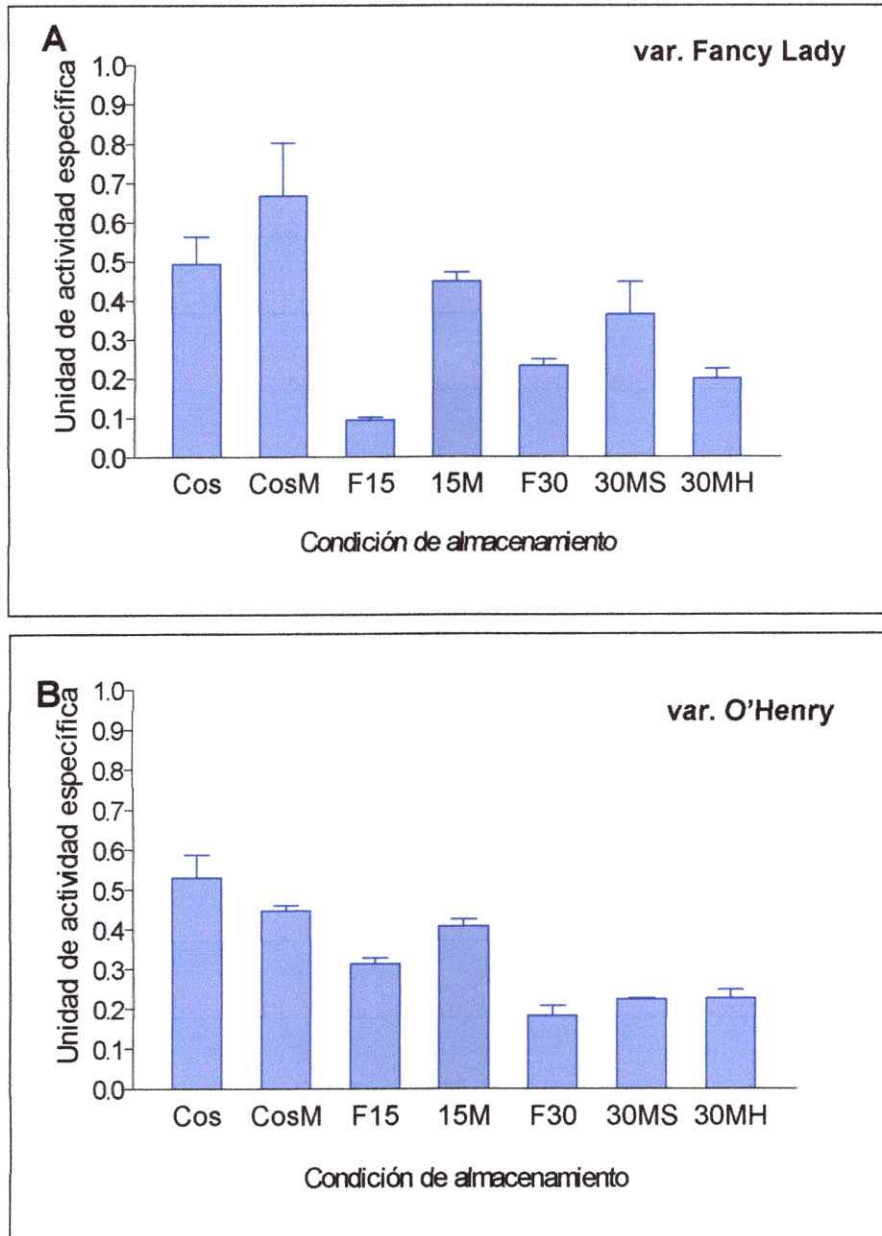


Figura 9: Análisis de la actividad enzimática para el gen PpPME de *Prunus persica*. A: var. Fancy Lady B: var. O'Henry. Una Unidad de Actividad se define como la cantidad de μ moles ácido galacturónico/ (mg totales de proteína por 3 min.) Cos: Cosecha; CosM: Cosecha Maduro; F15: 15 días almacenaje en frío; 15M: 15 días almacenaje Maduro; F30: 30 días almacenaje en frío; 30MS: 30 días almacenaje Maduro "Sano"; 30MH: 30 días almacenaje Maduro Harinoso.

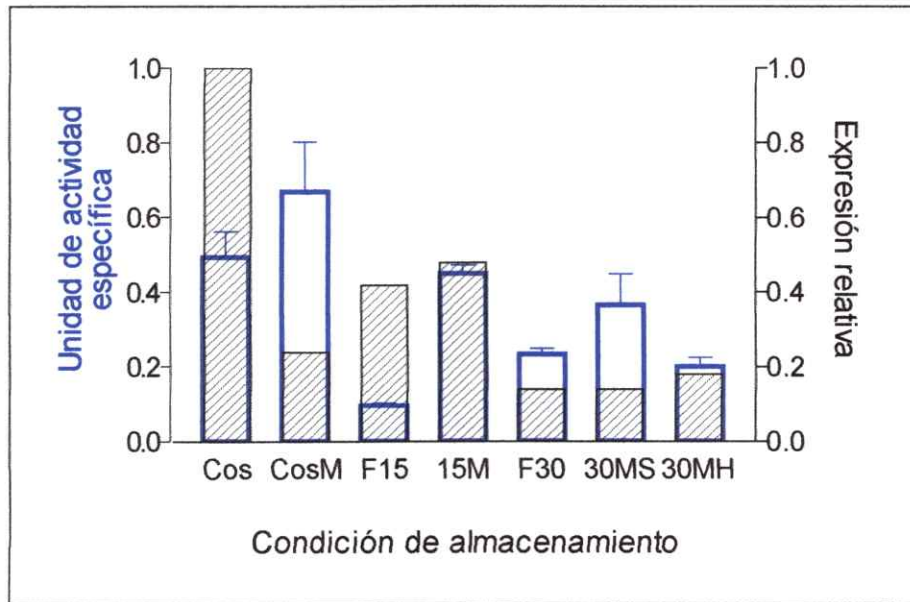


Figura 10: Resumen de la expresión y actividad enzimática de PME para la var. **Fancy Lady**. Las barras vacías con contorno azul representan la actividad específica de PME. En barras negras achuradas representan la expresión relativa del gen de PpPME.

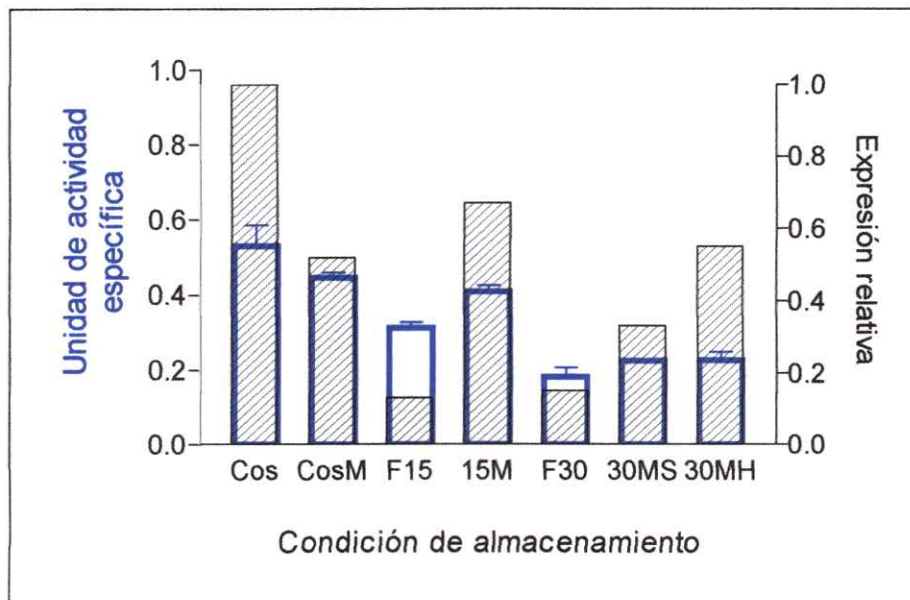


Figura 11: Resumen de la expresión y actividad enzimática de PME para la var. **O'Henry**. Las barras vacías con contorno azul representan la actividad específica de PME. En barras negras achuradas representan la expresión relativa del gen de PpPME.

3.4.5. Análisis de expresión del gen de Expansina (Exp) de *Prunus persica* durante la postcosecha, en variedades de duraznos Fancy Lady y O'Henry.

El análisis de expresión del gen de Expansina de *Prunus persica* se realizó ocupando como sonda el cDNA parcial obtenido en el desarrollo de esta tesis, el cual en las condiciones de hibridación de alta estrictez nos permitió visualizar un solo transcrito con un tamaño aproximado de 1350 pb (Fig. 12). El análisis de Northern blot para las dos variedades estudiadas, nos mostró la aparición de un transcrito en el estadio de cosecha (Cos), condición en la cual la fruta se encuentra fisiológicamente madura pero firme. Posteriormente, en los frutos maduros (CosM), es decir, los que han alcanzado una madurez suficiente para ser consumidos (ver Sección 2.1 de Materiales y Métodos), se observó una mayor acumulación del transcrito, comparado con Cos, para la variedad Fancy Lady, mientras que en la misma condición, los duraznos de la variedad O'Henry mostraron un nivel de transcrito muy similar a la condición de cosecha. Luego de 15 días de almacenamiento a 0°C (F15), la cantidad de transcrito en DFL y DOH disminuyó a niveles imperceptibles, resultado que se repitió cuando el fruto se mantuvo por 30 días almacenado a 0°C (F30). Los frutos maduros después de 15 días de almacenamiento (15M) mostraron un aumento en el nivel del transcrito de Expansina, pero sin alcanzar los niveles observados durante el estadio cosecha. En los duraznos DFL observamos que los frutos maduros después de 30 días de almacenaje (30M) muestran diferencia en el contenido del transcrito al comparar los frutos que tienen jugo de aquellos harinosos, presentando estos últimos un menor nivel que los jugosos. Por otro lado, en la variedad DOH la diferencia entre los frutos maduros jugosos y los harinosos es acentuada, y es en los frutos maduros que tienen jugo donde Expansina muestra el mayor nivel de expresión.

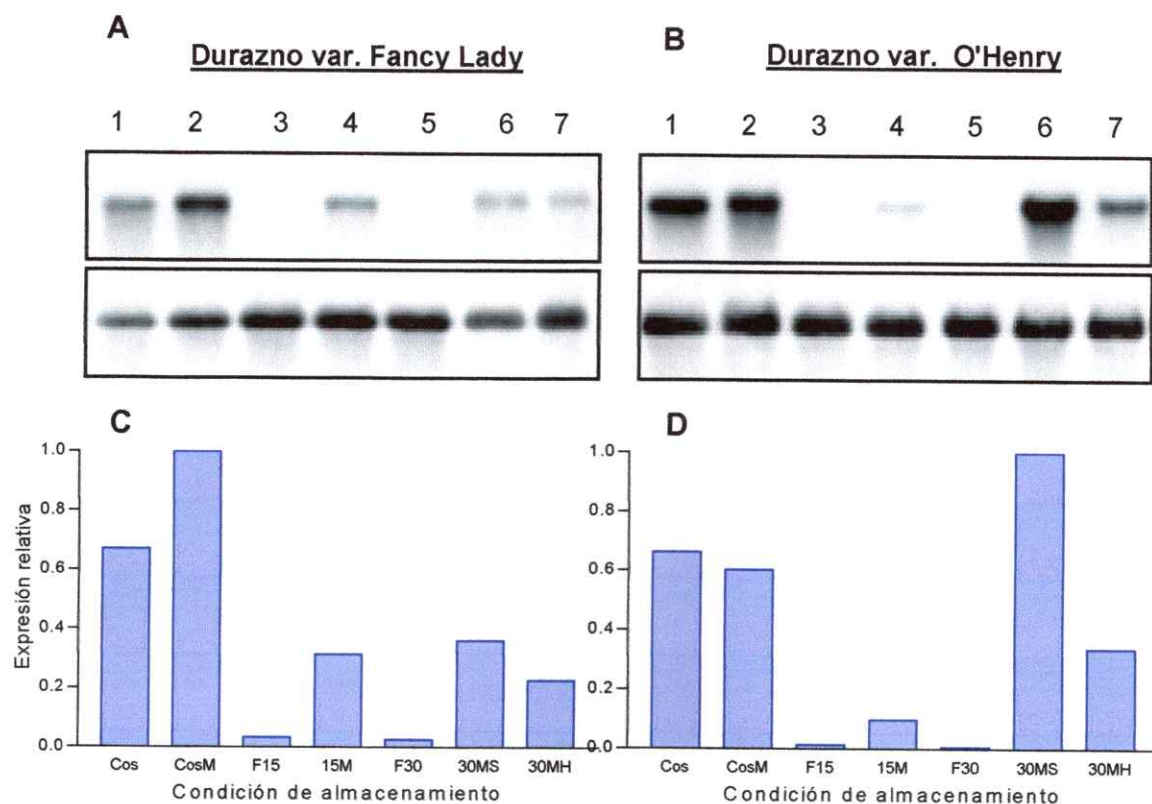


Figura 12: Análisis de expresión génica para el gen PpExp de *Prunus persica*. **A:** var. Fancy Lady **B:** var. O'Henry. Panel superior: Análisis de Northern blot para el gen PpExp. Panel inferior: Análisis de Northern blot para el gen r18S de *Prunus persica*, como control de carga. **C** y **D:** Expresión relativa del gen de PpExp calculada a partir del estadio que presenta mayor expresión (Sección 2.8.4 Materiales y Métodos) para DFL y DOH, respectivamente. 1.-Cosecha (Cos) 2.-Cosecha Maduro (CosM) 3.-15 días almacenaje en río (F15) 4.- 15 días almacenaje Maduro (15M) 5.- 30 días almacenaje en frío (F30) 6.-30 días almacenaje Maduro Sano (30MS) 7.-30 días almacenaje Maduro Harinoso (30MH).

3.4.6. Análisis del contenido de la proteína Expansina de *Prunus persica* durante la postcosecha, en variedades de duraznos Fancy Lady y O'Henry.

El uso de un anticuerpo contra la proteína Expansina de tomate (*Lycopersicon esculentum*), nos permitió el análisis del patrón de acumulación de la proteína Expansina en *Prunus persica* (Fig. 13). La inmunodetección por parte del anticuerpo de Expansina 1 de tomate, revela la presencia de una banda de aproximadamente 27KDa, tamaño descrito para diversas Expansinas de dicotiledónea, ésta señal la observamos en la condición de cosecha para ambas variedades, la cual aparece nuevamente cuando el fruto maduró. Luego de un período de almacenamiento de 15 y 30 días en frío no se observó la presencia de la proteína, tanto en DFL como en DOH, situación muy similar a lo que se aprecia en los análisis de northern blot para Expansina (Fig. 12). En aquellos frutos maduros que provienen de 15 días de almacenamiento a 0°C (15M), se observó la presencia de una señal detectada por el anticuerpo lo que sugiere que en la maduración se produjo una acumulación de la proteína Expansina. Los análisis realizados sobre los frutos maduros de la variedad DFL después de 30 días de almacenamiento a 0°C (30M), mostraron una proteína reconocida por el anticuerpo en aquellos frutos con jugo (30MS), mientras que en los frutos maduros harinosos (30MH) no detectó una señal. Cuando se analizaron los frutos de la variedad DOH en la condición de frutos maduros después de 30 días a 0°C, se observó un patrón muy similar a DFL, donde los frutos con jugo presentaron una señal reconocida por el anticuerpo que corresponde al tamaño esperado de Expansina, mientras que en los frutos harinosos, hubo una disminución de esta señal sugiriendo que en duraznos harinosos existe un menor contenido de Expansina.

Las figuras 14 y 15 muestran un resumen de la acumulación de proteína y la respectiva expresión relativa para Expansina en cada una de las condiciones estudiadas para las variedades Fancy Lady y O'Henry.

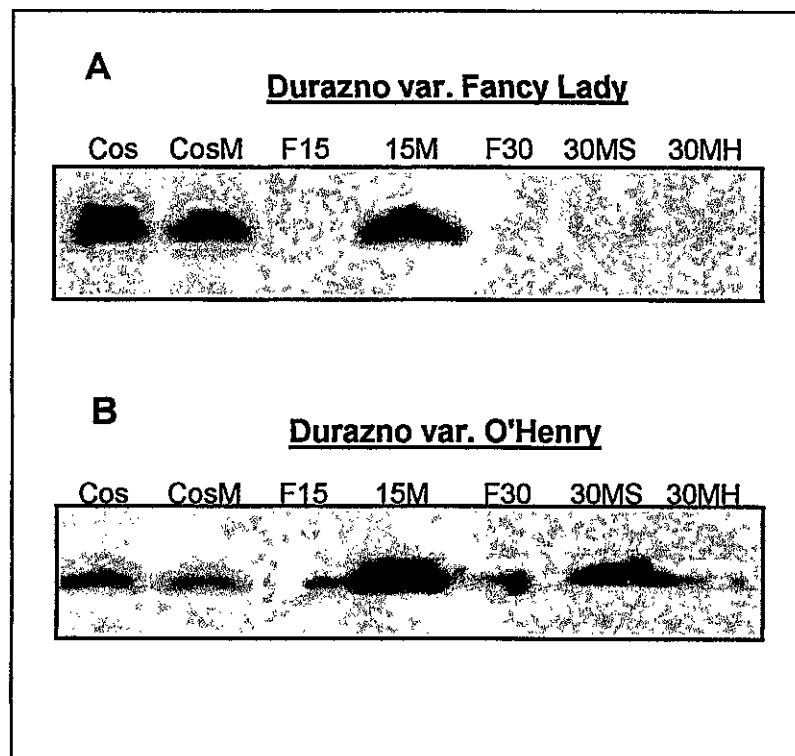


Figura 13: Inmunodetección de PpExp en variedades Fancy Lady y O'Henry, utilizando anticuerpo LeExp1 de tomate. A: var. Fancy Lady B: var. O'Henry. Cos: Cosecha, CosM: Cosecha Maduro, F15: 15 días almacenaje en frío, 15M: 15 días almacenaje Maduro, F30: 30 días almacenaje en frío, 30MS: 30 días almacenaje Maduro "Sano" y 30MH: 30 días almacenaje Maduro Harinoso Cada carril del gel se cargó con 30 μ g de proteínas totales.

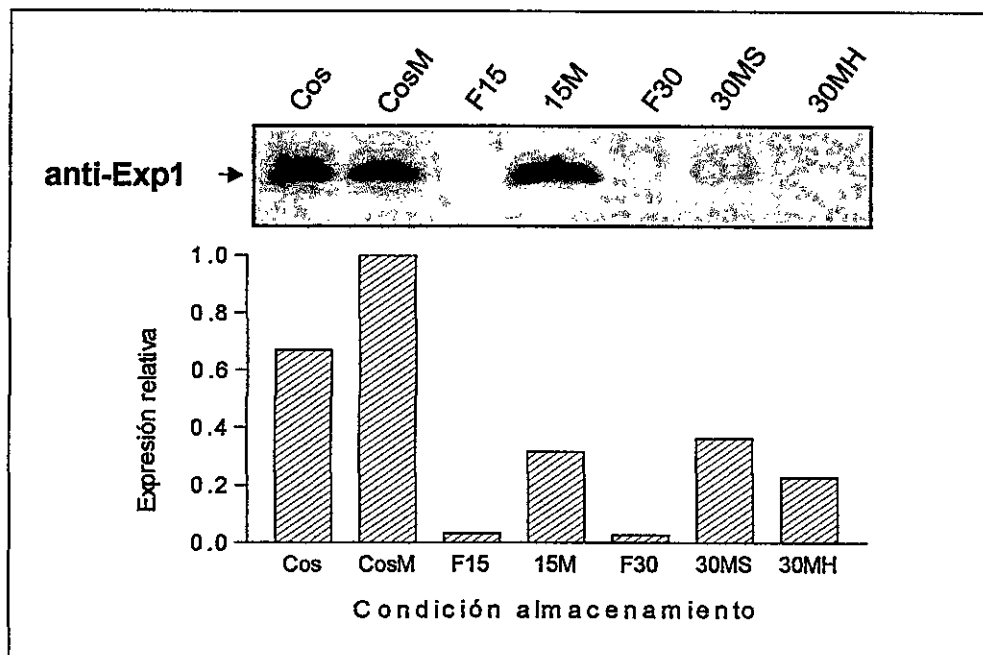


Figura 14: Resumen de la expresión y acumulación de proteína de Exp para la var. Fancy Lady. En la parte superior se muestra la acumulación de proteína de PpExp y en el gráfico la expresión relativa de PpExp.

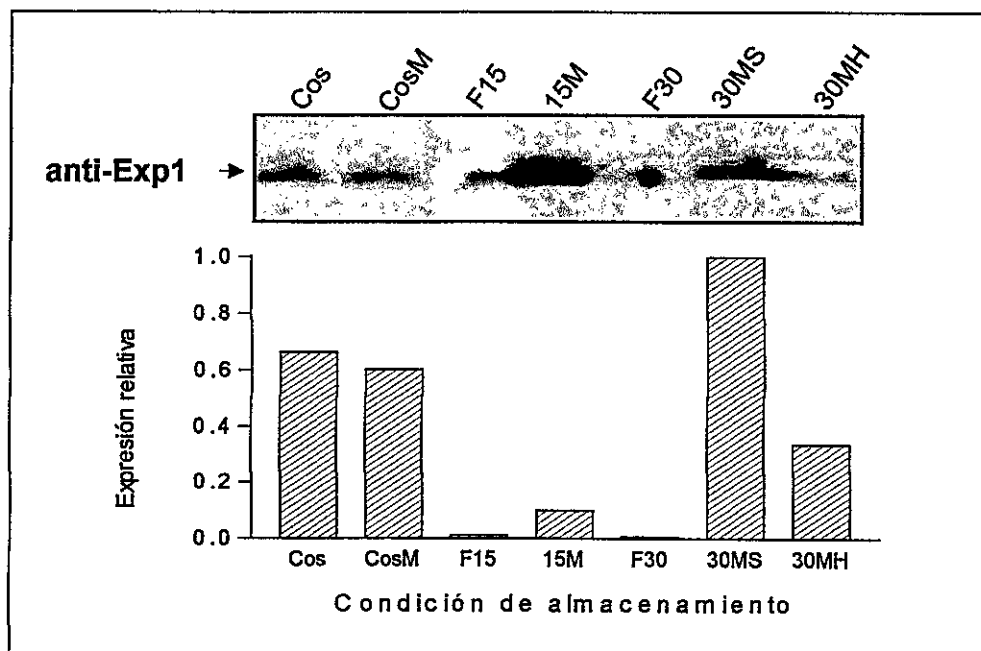


Figura 15: Resumen de la expresión y acumulación de proteína de Exp para la var. O'Henry. En la parte superior se muestra la acumulación de proteína de PpExp y en el gráfico la expresión relativa de PpExp.

3.4.7. Análisis de las razones de las actividades enzimáticas de Poligalacturonasa y Pectina Metilesterasa de *Prunus persica*.

En la literatura se ha planteado que las enzimas Poligalacturonasa y Pectina Metilesterasa actúan de forma coordinada en la degradación de pectina, por lo tanto, el análisis conjunto de la actividad de ambas enzimas puede arrojar luces sobre las posibles alteraciones en la degradación de este polímero, de manera que ayuden a explicar el desorden fisiológico que tiene como consecuencia la harinosidad de los frutos.

En la tabla 2 se muestra el análisis de las razones de las actividades enzimáticas de Poligalacturonasa y de Pectina Metilesterasa, para ambas variedades de duraznos. Los resultados de este análisis nos muestra que los frutos firmes, es decir, los frutos que provienen de la cosecha (Cos) y los frutos que salen de períodos de almacenamiento de 15 y 30 días (F15 y F30), tienen razones de las actividades de PG/PME menores que la razón de PG/PME de los frutos maduros, es decir, de CosM, 15M, 30MS y 30MH. Este análisis concuerda con lo descrito en literatura (Lurie y col., 1994 y 2003), donde se describe, que en los fenómenos de ablandamiento de la fruta durante la maduración, la razón de PG/PME aumenta. Esta razón también aumenta al almacenar los duraznos en frío, siendo el aumento a 30 días mayor que a 15 de almacenamiento. Sin embargo, los frutos que maduraron a partir de fruta almacenada en frío también incrementaron la razón PG/PME. Finalmente, el análisis de la razón de la actividad de ambas enzimas en frutos maduros después de haber sido almacenados por 30 días (30M), nos muestra que la razón de PG/PME de los frutos que presentaron

jugo (30MS) es mayor que la razón de PG/PME de los frutos harinosos (30MH). Este resultado se observó en las dos variedades de duraznos analizadas.

Tabla 2: Análisis de las razones de actividad enzimática para Poligalacturonasa y Pectina Metilesterasa (PG/PME) de ambas variedades de *P. persica*, en las distintas condiciones de almacenamiento. En el esquema posterior a la tabla se muestra la tendencia de los frutos a tornarse harinosos.

	Condición de almacenamiento						
	Cos	CosM	F15	15M	F30	30M "Sano"	30M Harinoso
Razón de PG/PME (ψ) en var. DFL ($\times 10^2$)	2.6	5.0	7	22	10.7	18	14.1
Razón de PG/PME (ψ) en var. DOH ($\times 10^2$)	5.5	17.3	10	31.6	12.6	28.4	24.6



ψ Razones calculadas a partir de los valores de actividades enzimáticas mostradas anteriormente en las secciones 3.4.2 para Poligalacturonasa y 3.4.4 para Pectina Metilesterasa, en ambas variedades de duraznos.

DISCUSIÓN

El problema de harinosidad de los duraznos se ha abordado desde hace unas décadas modificando los procesos de postcosecha, principalmente en temas relacionados con las condiciones de almacenamiento a bajas temperaturas del fruto, atmósfera controlada, ó utilizando tratamientos de aumento de temperatura entre períodos de almacenaje (Intermittent warming) (Artés y col., 1996; Zhou y col., 2001). Por otro lado, se ha observado que las distintas variedades de duraznos muestran distintos niveles de susceptibilidad a tornarse harinosos a bajas temperaturas durante la postcosecha (Von Mollendorff y col., 1992; Luchsinger 1996a y 1997). Este último punto nos llevó a evaluar el grado de harinosidad en distintas variedades de duraznos determinando finalmente que las variedades de Fancy Lady y O'Henry presentaron distinta susceptibilidad al daño por frío, concluyendo que DFL tiene un mayor potencial de almacenamiento a 0°C que DOH, es decir, la variedad Fancy Lady puede ser almacenada por más tiempo que la variedad O'Henry. Diversos estudios han sugerido que la harinosidad se produce por alteraciones en el desensamblaje de la pared celular, por lo tanto la susceptibilidad diferencial de las variedades de DFL y DOH nos llevó a plantear que existe una diferencia a nivel de las proteínas que participan en este proceso, específicamente en procesos de ablandamiento en condiciones de postcosecha.

En la última década, han sido extensas las investigaciones en el ámbito molecular y bioquímico en la búsqueda de una proteína responsable de los fenómenos que causan la harinosidad. Estudios de actividad enzimática realizados en fruta sin daño por frío, han mostrado que algunas enzimas aumentan su actividad a lo largo del

proceso "normal" de maduración como son la Pectina Metilesterasa y α -arabinosidasa, otras aumentan en estados tempranos de maduración, pero luego declinan como son la *exo*-PG y la carboximetilcelulosa, mientras que otras continúan incrementando hasta estados de sobre-maduración, en estados de senescencia como son la *endo*-PG, β -galactosidasa y la *endo*-1,4 - β -mananasa (Fisher y Bennett, 1991; Rose y Bennett, 1997; Zhou y col., 2000 a y b; Brumell y Harpster 2001; Trainotti y col., 2003; Brumell y col. 2004 a y b). Mientras que en situaciones donde el fruto se ve enfrentado a almacenamiento a bajas temperaturas, algunas de estas enzimas disminuyen su actividad enzimática, como *endo*-PG y β -galactosidasas (Zhou y col., 2000b; Brumell y col. 2004b) ó proteínas como la Expansina disminuyen su acumulación durante ésta situación de almacenamiento (Obeland y col., 2003).

En este trabajo se analizaron los cambios que ocurren a nivel de la acumulación de proteínas y de los transcritos de tres proteínas que se han relacionado con el desensamblaje de la pared celular, estas proteínas son Poligalacturonasa, Pectina Metilesterasa y Expansina. Los resultados de esta tesis muestran que en frutos recién cosechados y en frutos maduros, se observó un aumento en la acumulación del transcrito de PpPG y PpExp, lo que coincide posteriormente con la actividad enzimática y acumulación de la proteína, respectivamente, en cambio para PpPME se observó que para frutos recién cosechados la acumulación de transcrito fue mayor que el nivel de transcrito del fruto maduro. Por otra parte la actividad enzimática de PpPME es similar en ambos casos. Si estas tres proteínas actúan coordinadamente, con los resultados obtenidos y la evidencia de literatura (Brumell y col. 2004a; McQuenn-Mason y Cosgrove, 1994), es consecuente pensar que Pectina metilesterasa y

Expansina actuarían en etapas tempranas de la maduración, para permitir el acceso de otras enzimas a sus substratos, en la que Expansina interrumpiría la unión de interacciones no covalentes entre componentes poliméricos, y con esto, PME podría tener mejor acceso sobre los grupos metilos del polímero de Ac. Galactúronico, permitiendo posteriormente que Poligalacturonasa ejerza su acción enzimática sobre los enlaces α -1,4 del ácido galacturónico, y de otras enzimas que participan en procesos de ablandamiento, para finalmente tener un fruto blando y jugoso. Posteriormente en las condiciones de almacenamiento de postcosecha de 0°C durante 15 y 30 días se produjo una disminución casi total en la acumulación del mensajero de PpPG y PpExp, efecto reflejado también en la actividad enzimática de PpPG y en la acumulación de la proteína de PpExp, esto pudo deberse que al igual que otras proteínas involucradas en los procesos de maduración de los frutos, Poligalacturonasa y Expansina son reguladas por la hormona etileno (Montgomery y col., 1993; Sitrit y Bennett, 1998; Giovannonni , 2001 y 2004; Dong y col. 2001), y en estudios anteriores se observó que en nectarines expuestos a bajas temperaturas y que desarrollan harinosidad tienen alterada su capacidad de producir etileno, y por lo tanto, afectar la acción regulatoria que puede tener esta hormona sobre la traducción del mRNA ó la estabilidad de las proteínas de PG y Exp, al verse afectada la acumulación de la hormona (Dong y col. 2001; Zhou y col. 2000a, 2001; Hoeberichts y col., 2002). Sin embargo, no existe una completa anulación en la acumulación del transcrito de PpPG ó de su actividad, esto debido quizás al hecho que se ocupó como sonda en los ensayos un fragmento de cDNA de PG diseñado a partir de una zona conservada para estos genes, por lo que podría estar reconociendo más de una secuencia que codifique para PG de durazno, ya que como se ha descrito en la literatura, se han encontrado alrededor de 50 genes codificantes para PG en *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis

Genome Initiative, 2000) (Hadfield y Bennett, 1998). En todo caso si la sonda utilizada reconoce otro transcrito este debería tener una alta homología y un tamaño similar al descrito en este trabajo. Por otra parte, experimentos con plantas transgénicas indican que la supresión en la expresión de un gen de PG tiene un pequeño efecto sobre el desensamble de pectinas sugiriendo que existe una redundancia en la actividad de Poligalacturonasa en tomate (Giovannoni y col., 1989; Glover y col., 1996; Hadfield y Bennett, 1998). Esto apoyaría la idea que existe más de un gen para PG en duraznos, es más, análisis de alineamiento de ésta sonda de PG con una base de datos de EST para *Prunus persica* del proyecto Genoma Iniciativa Chile (datos no mostrados), nos muestra que de las 43 secuencias anotadas con una putativa función de Poligalacturonasa, la secuencia de la sonda diseñada para PpPG alinea con 26 de las secuencias anotadas (dato no mostrado).

Como se mencionó anteriormente, los genes que son regulados por etileno sufren una regulación negativa al verse expuesto a bajas temperaturas dado la alteración que ocurre en la vía de esta hormona, lo que nos lleva a pensar que si la dependencia de esta hormona es tan estrecha, no veríamos acumulación del transcrito en procesos posteriores, ya que fue interrumpida su regulación positiva. Sin embargo, los resultados para la expresión génica de PG y Exp, ó la actividad enzimática ó acumulación de la proteína, muestran un aumento respectivamente, tanto en la variedad DFL como en DOH cuando el fruto madura después de haber sido almacenado a 0°C (15M y 30M). Se ha descrito en plantas, que después de 3 días de aplicado un stress como frío, se observa un aumento en la cantidad de etileno medido (Stearns y Glick, 2003). Si pensamos solamente en la dependencia en expresión que tienen PG y Exp con etileno, puede explicarse el hecho de tener un aumento en

mensajero y actividad enzimática y acumulación de proteína de estos dos genes, ya que el stress provocado por la exposición a bajas temperaturas haría aumentar la cantidad de etileno endógeno y por ende, regular de forma positiva estos genes, aumentando su expresión, con la posterior consecuencia de ablandamiento del fruto en la post-cosecha.

Como se mencionó en un principio, se han realizado grandes esfuerzos para encontrar una proteína responsable de los daños provocados en la pulpa de los frutos que han sido expuestos a bajas temperaturas por períodos prolongados. En un intento de encontrar factores que correlacionen con la harinosidad, en este trabajo analizamos las actividades enzimáticas de PG y PME, encontrándose que por sí solas no eran capaces de explicar la harinosidad que desarrollan cada variedad evaluada. Sin embargo, pensando que estas dos enzimas actúan de forma coordinada, estudiamos la razón de sus actividades, encontrando una tendencia a aumentar cuando el fruto pasaba de una condición de pulpa firme a una condición de pulpa blanda, es decir, el paso a un fruto con madurez comestible (8,9- 17,8 N). Esta tendencia a aumentar la razón de PG/PME, encontrada en DFL y DOH, se relaciona con lo descrito recientemente por Zhou y col., 2000 a y b; Lurie y col. 2003; Brumell y col. 2004 a y b, donde se describe que la actividad de PG aumenta en el fruto maduro, en relación con el fruto firme. El análisis realizado sobre las actividades de los frutos que presentan harinosidad (30MH), nos muestra que la razón de PG/PME aumenta en relación con el fruto firme de la misma condición (F30), sin embargo, el mismo análisis pero con el fruto jugoso (30MS), nos muestra que la razón de PG/PME es menor en el durazno harinoso que en el durazno con jugo. Esto lleva a pensar, que efectivamente ocurre un

desbalance en las actividades de Poligalacturonasa y Pectina Metilesterasa, las cuales posiblemente se encuentren coordinadas.

Como se mencionó en un principio, se han realizado grandes esfuerzos para encontrar una proteína responsable de los daños provocados en la pulpa de los frutos que han sido expuestos a bajas temperaturas por períodos prolongados. En un intento de encontrar factores que correlacionen con la harinosidad, en este trabajo analizamos las actividades enzimáticas de PG y PME, encontrándose que no existe una correlación directa entre la actividad de estas enzimas y la harinosidad que desarrollan las variedades evaluadas. Sin embargo, pensando que estas dos enzimas actúan de forma coordinada, estudiamos la razón de sus actividades, encontrando una tendencia a aumentar cuando el fruto pasa de una condición de pulpa firme a una condición de pulpa blanda, es decir, el paso a un fruto con madurez comestible (8,9-17,8 N). Esta tendencia a aumentar la razón de PG/PME, encontrada en DFL y DOH, se relaciona con lo descrito recientemente por (Zhou y col., 2000 a y b; Lurie y col. 2003; Brumell y col. 2004 a y b), donde se describe que la actividad de PG aumenta en el fruto maduro, en relación con el fruto firme. El análisis realizado sobre las actividades de los frutos que presentan harinosidad (30MH), nos muestra que la razón de PG/PME aumenta en relación con el fruto firme de la misma condición (F30), sin embargo, el mismo análisis realizado en frutos almacenados en frío por 30 días pero que todavía presentan jugo (30MS), nos muestra que la razón de PG/PME es menor en el durazno harinoso que en el durazno con jugo. Esto lleva a pensar, que efectivamente ocurre un desbalance en las actividades de Poligalacturonasa y Pectina Metilesterasa, las cuales posiblemente se encuentren coordinadas.

El aumento ó disminución de la razón de PG/PME descrito en la literatura, no explica si los cambios en la razón son producto de los cambios en una ó ambas actividades enzimáticas, especialmente la de PME, ya que como se mencionó anteriormente, no existe un consenso si la actividad de PME se mantiene, aumenta ó disminuye durante la postcosecha del fruto. Los datos nos muestran por ejemplo, que el aumento de la razón PG/PME desde el estado de fruto firme en la cosecha (Cos) a un fruto blando en el estado de cosecha maduro (CosM), ocurre principalmente por un aumento en la actividad de PG, situación que se refleja para Fancy Lady y O'Henry. Posteriormente, luego que la fruta se almacenó por 15 días a 0°C, se observa que el aumento en la razón de PG/PME en el fruto maduro (15M) nuevamente ocurre por el aumento en la actividad de PG, ya que en DFL se observa que PG aumenta alrededor de 9 veces (Fig. 5A), mientras que PME, aumenta cerca de 4 veces (Fig. 9A). En la variedad DOH se observa una situación similar, donde la actividad de PG aumenta aproximadamente 4 veces (Fig. 5B) y la actividad de PME aumenta solo 1.3 veces (Fig. 9B). El análisis de los resultados sobre duraznos almacenados por 30 días a 0°C, nos muestra que en la variedad Fancy Lady existe un aumento en la actividad de PG cercano a las 3 veces (aumento menor al producido en los frutos de 15 días de almacenamiento), mientras que PME prácticamente no aumenta (en 30MS). Pero en el fruto harinoso, la actividad de PG y de PME no cambia, respecto del fruto firme (F30). En la variedad O'Henry, el fruto que presenta jugo después de 30 días de almacenamiento a 0°C, muestra un aumento de alrededor de 3 veces en la actividad de PG, mientras que PME se mantiene (respecto a F30). Mientras que el durazno harinoso aumenta cerca del doble la actividad de PG, y la actividad de PME se mantiene a valores cercanos al fruto firme y al fruto que presenta jugo.

Los datos obtenidos no permiten establecer una clara relación entre las actividades enzimáticas estudiadas y la susceptibilidad a la harinosidad que cada variedad de duraznos presenta al ser almacenados a bajas temperaturas. Sin embargo, nos lleva a plantear que aquella variedad de durazno ó nectarín que durante la postcosecha mantenga o aumente una relación de PG/ PME cercana a la condición de un fruto jugoso, será capaz de soportar mejor las largas exposiciones a frío, manteniendo la calidad del fruto y por lo tanto mejores condiciones para su exportación y posterior comercialización.

CONCLUSIONES

- En los diferentes estados de postcosecha no se observa una relación directa entre la acumulación del transcrito y actividades enzimáticas de Poligalacturonasa y Pectina Metilesterasa.
- La exposición a bajas temperaturas disminuye de forma acentuada la acumulación del transcrito y la proteína de Poligalacturonasa y Expansina, en ambas variedades de duraznos. Por otro lado, Pectina Metilesterasa, disminuye pero este cambio es menos acentuado que el observado para Poligalacturonasa y Expansina.
- Los resultados indican que el almacenamiento por frío provoca un desbalance en el nivel de enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo de la pared celular de *Prunus persica*, sin embargo, la comparación de los niveles de transcritos de PG, PME y Expansina así como los niveles de actividad enzimática y proteína correspondiente en variedades que poseen diferencias en la susceptibilidad a tornarse harinosos no mostraron grandes diferencias de comportamiento excepto por un leve cambio en la razón de actividad PG/PME la cuál es menor en duraznos harinosos que en aquellos que presentan jugo a pesar de haber pasado por el mismo proceso de almacenamiento.

BIBLIOGRAFÍA

A.N.A. Chile: Andes Nursery Association Chile (2004) (comunicación personal con Rodrigo Cruzat) y Asociación de Exportadores de Chile, www.cffa.org.

Artés F., Cano A. y Fernández-Trujillo J.P. (1996) Pectolytic Enzyme Activity During Intermittent Warming Storage of Peaches. *Journal of Food Science* 61: 311-314.

Ben-Arie, R. and Lavee S. (1971) Pectin changes occurring in Alberta peaches suffering from wooly breakdown. *Phytochemistry* 10: 531-538.

Ben-Arie R., y Sonogo L. (1980) Pectolytic enzyme activity involved in wooly breakdown of stored peaches. *Phytochemistry* 19: 2553-2555.

Bollag D.M. y Edelstein S.J. (1991) *Protein Methods*. Wiley-Liss, New York.

Brady C.J. (1987) Fruit Ripening. *Annu Rev. Plant Physiol* 38: 155-178.

Brummell D.A., Harpster M.H., Civello P.M., Palys J.M., Bennett A.B. y Dunsmuir P. (1999) Modification of Expansin Protein Abundance in Tomato Fruit Alters Softening and Cell Wall Polymer Metabolism During Ripening. *The Plant Cell* 11; 2203-2216.

Brummell D. y Harpster M. (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47: 311-340

Brumell A., Dal Cin V., Crisosto C. y Labavitch J. (2004a) Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany*. Advance Access published July 30: 1-11

Brumell A., Dal Cin V., Lurie S., Crisosto C. y Labavitch J. (2004b) Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. *Journal of Experimental Botany*. Advance Access published August 13: 1-12.

Callahan A., Morgens P., y Cohen R. (1993) Isolation and Initial Characterization of cDNA As for mRNAs Regulated During Peach Fruit Development. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118: 531-537

Chang S., Puryear J. y Cairney J. (1993) A simple and Efficient Method for isolating RNA from Pine Trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11: 113-116.

Cosgrove D. (1998) Cell Wall Loosening by Expansins1. *Plant Physiol.* 118: 333-339

Cosgrove D. (2000) New genes and new biological roles for expansins. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 73-78.

Cosgrove D. Li L.C., Cho H., Hoffmann-Benning S., Moore R.C. y Blecker D. (2002) The Growing Worl of Expansins. *Plant Cell Physiol.* 43: 1436-1444.

Dawson D., Melton L. y Watkins C. (1992) Cell wall changes in nectarines (*Prunus persica*) Solubilization and depolymerization of pectin and neutral polymers during ripening and mealy fruit Plant Physiol. 100, 1203-1210.

Dong L., Zhou H-W., Sonogo L., Lers A. y Lurie S. (2001) Ethylene involvement in the cold storage disorder of 'Flavortop' nectarine. Postharvest Biology and Technology 23, 105-155.

Frenkel C., Peters J., Tieman D., Tiznado M. y Handa A. (1998) Pectin Methylesterase Regulates Methanol and Ethanol Accumulation in Ripening Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Fruit. The Journal of Biological Chemistry 273: 4293-4295.

Fischer R. y Bennett A. (1991) Role of Cell Wall Hydrolases in Fruit Ripening. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 675-703.

Gehrig H., Winter K., Cushman J., Borland A. y Taybi T. (2000) An Improved RNA Isolation Method for Succulent Plant Species Rich in Polyphenols and Polysaccharides. Plant Molecular Biology Reporter 18: 369-376

Giovannonni J., DellaPenna D., Bennett A. y Fischer R. (1989) Expression of a Chimeric Polygalacturonase Gene in Transgenic *rin* (Ripening Inhibitor) Tomato fruit Result in Polyuronide Degradation but not Fruit Softening. The Plant Cell 1: 53-63.

Giovannonni J. (2001) Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52: 725-749.

Giovannonni J. (2004) Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. The Plant Cell 16, Supplement: 170-180.

Glover H., Brady C.J., Lee E. y Speirs J. (1996) Multiple pectin esterase genes are expressed in ripening peach fruit: Nucleotide sequence of a cDNA encoding peach pectin esterase. The Electronic Plant Gene Register Plant Physiol. 112, 864.

Hadfield K. y Bennett A. (1998) Polygalacturonases: Many Genes in Search of a Function. Plant Physiol. 117: 337-343.

Hagerman A.E. y Austin P. (1986) Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. J. Agric Food Chem. 34: 440-444.

Hayama H., Shimada T., Ito A., Yoshioka H. y Kashimura Y. (2001) Changes in the levels of mRNA for putative cell wall-related genes during peach fruit development. Scientia Horticulturae 91: 239-250.

Hoerberichts F., Van Der Plas L. y Woltering E. (2002) Ethylene perception is required for the expression of tomato ripening-related genes and associated physiological changes even at advanced stages of ripening. Postharvest Biology and Technology 26: 125-133.

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

Inoue H., Nojima H. y Okayama H. (1991) High efficiency transformation of *E.coli* with plasmids. *Gen* 30: 23-28.

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

Lill R. E., y Van Der Mespel G. J. (1988) A method for measuring the juice content of mealy nectarines. *Scientia Horticulturae* 36, 267-271.

Luchsinger L. (1996a) Quantification of peach fruit maturity, injury and changes in cell wall composition during storage. PhD Diss. ©, University of Maryland, College Park, USA. p. 135

Luchsinger L. (1996b) Avances en el Estudio de los Desórdenes Fisiológicos en Frutos de Duraznos y Nectarines. En: I Curso Internacional de Postcosecha: Estrategias Tecnológicas de Postcosecha para Frutos de Carozo. Cap.VII; 1-9.

Luchsinger L. (1997) Problemática de la exportación de duraznos, nectarines y ciruelas. II Parte: Desórdenes Fisiológicos. *Aconex* 56, 27-32.

Lurie S., Levin A., Greve L. y Labavitch J. (1994) Pectin polymer changes in nectarines during normal and abnormal ripening. *Phytochemistry* 36: 11-17.

Lurie S., Zhou H.W., Lers A., Sonogo L., Alexandrov S. y Shomer I. (2003) Study of pectin esterase and changes in pectin methylation during normal and abnormal peach ripening. *Physiologia Plantarum* 119: 287

McQueen-Mason S. y Cosgrove D.J. (1994) Disruption of hydrogen between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6574-6578.

Mertz L.M. y Rashtchian A. PCR radioactive labeling system: A rapid method for synthesis of high specific activity DNA probes. *Focus* 16: 45-48.

Micheli F. (2001) Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci.* 6: 414-419.

Montgomery J., Goldman S., Deikman J., Margossian L. y Fischer RL. (1993) Identification of a Ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5939-5943.

NCBI: The National Center for Biotechnology Information. www.ncbi.nlm.nih.gov

Obeland D. y Carroll T. (2000) Mealiness and Pectolytic activity in peaches and nectarines in response to heat treatment and cold storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125 (6): 723-728.

Obenland D., Crisosto C. y Rose J. (2003) Expansin protein levels decline with the development of mealiness in peaches. *Postharvest Biology and Technology* 29: 11-18.

Pressey R. y Avants K. (1973) Separation and Characterization of Endopolygalacturonase and Exopolygalacturonase from Peaches. *Plant Physiol.* 52: 252-256.

Retamales J. (1996) Desórdenes fisiológicos en duraznos y nectarines: importancia y control. En: *Curso Internacional de Frutales de Carozo*. 4-5 Marzo. Santiago, Chile.

Ridley B., O'Neill M. y Mohnen D. (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57: 929-967.

Rose J. y Bennett A. (1997) Expression of divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94: 5955-5960.

Rose J., Cosgrove D., Albersheim P., Darvill A. y Bennett A. (2000) Detection of Expansin Proteins and Activity during Tomato Fruit Ontogeny. *Plant Physiology*, Vol. 123: 1583-1592.

Sambrook J, Fritsch EF. y Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Plainview, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sitrit Y. y Bennett A. B. (1998) Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: A re-examination. *Plant Physiology* 116: 1145-1150.

Stearns J., y Glick B. (2003) Transgenics plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnology Advances* 21: 193-210.

Trainotti L., Zanin D. y Casadoro G. (2003) A cell wall-oriented genomic approach reveals a new and unexpected complexity of the softening in peaches. *Journal of Experimental Botany* 18: 1-12

Von Mollendorff L. y De Villiers O. (1988) Role of pectolytic enzymes in the development of woolliness in peaches. *Journal of Horticultural Science* 63, 53-58.

Von Mollendorff L., Jacobs G. y De Villiers O. (1992) The effects of storage temperature and fruit size on firmness, extractable juice, woolliness and browning in two nectarine cultivars. *Journal of Horticultural Science* 67: 647-654

Willats W., McCartney L., Mackie W. y Knox P. (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* 47: 9-27.

Xiang C., Wang H., Shiel P., Berger P. y Guerra D.J. (1994) A modified alkaline lysis miniprep protocol using a single microcentrifuge tube. *Biotechniques* 17: 30-32.

Zhou H, Lurie, S. Lers A., Khactchitski A., Sonogo L. y Ben-Arie R. (2000a) Delayed storage and controlled atmosphere storage of nectarines: two strategies to prevent woolliness. *Postharvest Biology and Technology* 18: 133-141

Zhou H-W., Ben-Arie R. y Lurie S. (2000b) Pectin esterase, polygalacturonase and gel formation in peach pectin fractions. *Phytochemistry* 55: 191-195

Zhou H-W., Lurie S., Ben-Arie R., Dong L., Burd S., Weksler A. y Lers A. (2001) Intermittent warming of peaches reduces chilling injury by enhancing ethylene production and enzymes mediated by ethylene. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 76: 620-628.