

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN  
PORTAINJERTOS DE PRUNUS SOMETIDOS A  
DEFICIENCIA DE OXÍGENO***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Ambiental  
y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

***PAMELA BEATRIZ FUENTES GAMBOA***

**Directora de Tesis: Dra. Tatiana Garrido**

**Co-Directora de Tesis: Dra. Paula Pimentel**

**Santiago-CHILE**

**Julio, 2023**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

**PAMELA BEATRIZ FUENTES GAMBOA**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica ambiental y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

\_\_\_\_\_

**Director de Tesis:**

**Dra. Tatiana Garrido** \_\_\_\_\_

**Co-director de Tesis:**

**Dra. Paula Pimentel** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Edward Fuentes** \_\_\_\_\_

**Dr. Mauricio Báez** \_\_\_\_\_

**Dra. Claudia Stange** \_\_\_\_\_

En memoria de mis abuelos. **Héctor Osvaldo Gamboa Barrera**, mi amado tata, la persona que me incentivó en vida a ser una profesional universitaria; y **Luis Alberto Fuentes Gutiérrez**, quien por medio de mi padre me traspaso el mensaje “Estudeé, estudeé”, llevándome donde estoy hoy.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias FONDECYT1190816, ANIDR19A1003, EQUR190003, el Gobierno Regional de O'Higgins y al Centro de Estudios Avanzados en Fruticultura (CEAF), proyectos e instituciones que han entregado tanto el financiamiento, como las infraestructuras necesarias para el desarrollo de esta tesis.

Quiero agradecer a mis directoras, ambas mujeres científicas. *Dra. Paula Pimentel* le agradezco por haberme recibido en su laboratorio, desafiándome a crecer como persona y profesional, además de mostrarme que se hace ciencia en mi región natal. *Dra. Tatiana Garrido*, le agradezco por aceptarme como su tesista y ser un fuerte apoyo, no solo en lo académico, sino que también en lo emocional, convirtiéndose en alguien de plena confianza para mí. Gracias a ambas por mostrarme, con sus ejemplos, quien quiero ser como profesional.

Estimados *Dr. Ariel Salvatierra*, *Dr. Guillermo Toro* y *Dr. Luis Villalobos*, les agradezco por las conversaciones de las que adsorbí grandes enseñanzas. Al equipo de trabajo del laboratorio de Fisiología del Estrés, muchísimas gracias queridas, *María Paz*, *Maira*, *Catalina*, *Marcia* y *Manon*, gracias por haber sido compañeras y amigas durante este proceso, independiente como finalizó todo quiero que sepan que guardan un lugar muy especial en mi corazón, las quiero mucho, espero siempre recuerden cuanto valen y cuánto vale su trabajo.

Por otro lado, creo que es importante ser capaz de mirar hacia el pasado, para entender como hemos llegado donde estamos hoy, por eso, es que le debo gran parte de mis logros a los profesores que me desafiaron intelectualmente, forjando los cimientos desde mis primeros años en prebásica en el colegio “Los Conquistadores” y a mis profesores de ciencias en la enseñanza media, donde (I.R.E.) me fueron abriendo los ojos hacia el camino de la ciencia, hasta descubrir, en el “Liceo Oscar Castro”, la existencia de esta hermosa carrera, Bioquímica.

Ya dentro de la carrera no quiero dejar fuera a quienes me han formado como profesional, recordándome ser meticulosa, disciplinada y mantener la ética del trabajo en ciencias, les agradezco a *Dr. Cotorás*, *Dra. Rojas*, *Dr. Quiñones*, *Dra. Navarrete* y *Bq.*

*Claudio Pérez*, gracias a cada uno por las oportunidades, correcciones y permitirme aprender de sus áreas de desarrollo y/o investigación.

Gracias al mejor grupo de divulgación científica con enfoque de género del país, *Pavoratona*, por permitir ausentarme durante este último año, gracias principalmente a los fundadores *Francisca Vargas, Andrés Urrutia, Jesús Lira y Sofía Vega*. ¡Los adoro!

También siento la necesidad de agradecer desde el fondo de mi corazón a mis queridos compañeros y amigos, quienes, sin tener la obligación, me enseñaron y apoyaron desde su labor, en cada uno de los laboratorios que visité. En primer lugar, agradecerte a ti, queridísima *Leslie Cerpa*, no solo eres una gran profesional, sino que una persona con un corazón noble, gracias por tus enseñanzas y tu constante disposición a ayudar, junto a ti le agradezco a *Daniela Poblete y Christopher Saavedra*, gracias por volver esos ambientes de trabajo agotadores en lugares cálidos y alegres.

Tuve el agrado de conocer personas muy especiales, quienes, de compañeros, se han convertido en amigos e incluso en familia, gracias por todo su apoyo a mis mejores amigas *Natalia Bozo y Paloma Navarrete*, nunca olvidaré cuando terminamos comiendo helado en Cerro Blanco, luego de una entrega de notas de Biología. Gracias queridos amigos *Paz Rojas, Nicole Saavedra, Camilo Vergara, Salvador Quiroz, Jose Aramburo, Eduardo Lamoza, Iván Gaete y Daniela Rojas*, cada uno de ustedes se encuentra en un lugar especial de mis recuerdos y sobre todo en mi corazón. Necesito agradecerle a cada uno, por sus abrazos y palabras de aliento, después de una evaluación (o a veces antes), por cada una de las horas que pasamos estudiando juntos, por esos almuerzos sentados en el pasto, sin importar si estaba mojado, o si bien, teníamos suerte y encontrábamos unas banquitas, gracias por los cumpleaños que celebramos juntos. Se que todos serán grandes profesionales, porque son grandiosas personas, llenas de valores y conocimientos (somos unos ñoños). Los admiro, los adoro, los quiero, los amo.

Y, finalmente, pero, definitivamente, no menos importante, gracias al apoyo incondicional de mi familia, gracias *mamita* por enseñarme lo que es el empoderamiento femenino en un rubro principalmente masculino, gracias darme tu apoyo constantemente,

independiente de la decisiones que tomara, incluyendo cuando te dije que quería estudiar algo “distinto”, gracias *papi* por creer siempre en tus hijas, gracias por enseñarme que las cosas se deben hacer bien hasta el final, pero que siempre serán “perfectibles” y que solo Dios es perfecto, gracias *Maggy*, por ser mi constante motor de fuerza, espero que puedas lograr cada uno de tus sueños y haber sido, en parte, un ejemplo para que eso ocurra. Muchas gracias, *tío Lelo* y *tía Sole*, por acogerme en su casa cuando peor lo estaba pasando, gracias por enseñarme con ejemplos de vida que no todo es fiesta y risas, gracias por enseñarme que, aunque duela el porrazo más adelante solo será un recuerdo y que lo que se haga debe nacer desde el amor y respeto.

Gracias, del fondo de mi alma, a mi amado, *Jordán Oses*, gracias primero por seguir a mi lado en los momentos de más estrés, gracias por secar mis lágrimas cuando creía que no podría más, gracias por tus abrazos, gracias por escucharme, gracias por celebrar mis pequeñas victorias, aun cuando yo no las creía importantes, gracias por dejarme volar, pero no quiero volar sola, preferiría caminar siempre que sea a tu lado, gracias por ser tú y gracias por creer en mí más de lo que yo misma puedo.

Por último, gracias a mí, gracias *Pame*, por elegir desafiarte cada día, gracias por no escuchar esa voz interna que decía “renuncia”, gracias por permitirme crecer, gracias por no perder esa curiosidad innata, que me lleva a aprender cada día algo nuevo y querer seguir aprendiendo.

Gracias a todos por ayudarme y participar en esta “carrera” junto a mí. ¡GRACIAS!

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de Tablas</b> .....	<b>ix</b>
<b>Abreviaciones</b> .....	<b>x</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>xi</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xii</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
Importancia económica de la fruticultura en Chile .....	1
Injertos para agricultura.....	1
Hipoxia radical .....	4
Efectos de hipoxia radical en <i>Prunus spp.</i> .....	5
Metabolismo asociado a estrés por hipoxia .....	7
<b>Oportunidad de investigación</b> .....	<b>12</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>12</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>13</b>
Objetivo General.....	13
Objetivos Específicos .....	13
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>14</b>
Material vegetal.....	14
Tratamiento de hipoxia y colecta .....	14
Equipos .....	15
Validación de metodología analítica para identificación y cuantificación de carbohidratos en <i>Prunus spp.</i> .....	15
<i>Selectividad o especificidad de la técnica</i> .....	15
<i>Linealidad</i> .....	16
<i>Precisión y exactitud</i> .....	16
<i>Sensibilidad</i> .....	17
<i>Robustez de la técnica</i> .....	18
<i>Implementación del método de extracción de azúcares en hojas y raíces</i> .....	20
<i>Efecto matriz</i> .....	22
Cuantificación de carbohidratos en hojas y raíces .....	22
Partidores .....	23
<i>Identificación in silico de secuencias génicas y aminoacídicas</i> .....	23
<i>Selección de genes y regiones a amplificar</i> .....	23
<i>Diseño y síntesis de partidores</i> .....	24
<i>Eficiencia experimental de partidores</i> .....	24
Análisis de expresión génica .....	25
<i>Extracción de RNA y síntesis de cDNA</i> .....	25
<i>Análisis de expresión génica mediante qPCR</i> .....	26
Análisis estadístico.....	26
<b>Resultados</b> .....	<b>27</b>
Validación de la metodología analítica .....	27
<i>Técnica analítica</i> .....	27

Concentración de carbohidratos en combinaciones de portainjertos de <i>Prunus spp.</i> .....	37
Identificación y diseño de partidores para SUS, INV y HK .....	45
Expresión génica de SUS, INV y HK en combinaciones de portainjertos de <i>Prunus spp.</i> ..	48
<b>Discusión de resultados</b> .....	<b>51</b>
<b>Conclusión</b> .....	<b>67</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>69</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>74</b>
Anexo 1. Condiciones de HPLC evaluadas .....	74
Anexo 2. Extracción de azúcares.....	75
Anexo 3. Identificación de SUS, INV y HK en M26 y F12.....	76
Anexo 4. Características de enzimas SUS, INV y HK <i>in silico</i> .....	78
Anexo 5. Totalidad de partidores diseñados y sintetizados. ....	83
Anexo 6. Síntesis de cDNA.....	84
Anexo 7. Resultados preliminares tasa fotosintética .....	84

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS PARA LA SELECCIÓN DE PORTAINJERTO.....	2
FIGURA 2. CAMBIOS GENERADOS EN SITUACIONES DE HIPOXIA RADICAL GENERADA POR SUELOS INUNDADOS.....	4
FIGURA 3. FENOTIPOS REPRESENTATIVOS DE LOS SIETE GENOTIPOS ANALIZADOS DESPUÉS DE 14 DÍAS DE TRATAMIENTO DE ANEGAMIENTO. ....	5
FIGURA 4. RECONFIGURACIÓN METABÓLICA BAJO ESTRÉS POR DEFICIENCIA DE O <sub>2</sub> EN PLANTAS..	8
FIGURA 5. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE MULTI ESTÁNDAR DISUELTOS EN ACETONITRILLO 50%, POR COLUMNAS ANIMO.....	28
FIGURA 6. GRÁFICO DE CAJAS PARA MEZCLA DE ESTÁNDARES 0,1M. ....	30
FIGURA 7. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS A PARTIR DE MUESTRAS VEGETALES.....	32
FIGURA 8. CROMATOGRAMAS INYECCIÓN DE MULTI ESTÁNDAR UTILIZANDO RESINA BOND ELUT NH <sub>2</sub> . ....	34
FIGURA 9. CANTIDAD INICIAL DE MUESTRA. ....	35
FIGURA 10. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE ESTÁNDARES PARA ESTÁNDARES EN MATERIAL VEGETAL. ....	36
FIGURA 11. CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES EN HOJAS EN COMBINACIONES DE PORTAINJERTOS “MARIANA 2624” Y “MAZZARD F12/1”. ....	38
FIGURA 12. CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES EN RAÍCES EN COMBINACIONES DE PORTAINJERTOS “MARIANA 2624” Y “MAZZARD F12/1”. ....	41
FIGURA 13. RAZÓN ENTRE CONCENTRACIONES OBTENIDAS EN HIPOXIA Y CONTROLES. ....	44
FIGURA 14. CURVA DE <i>MELTING</i> PARA PARTIDORES USADOS EN ESTE TRABAJO. ....	47
FIGURA 15. EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA EN HOJAS DE COMBINACIONES DE PORTAINJERTOS SOMETIDOS POR 10 DÍAS DE TRATAMIENTO POR HIPOXIA.....	49
FIGURA 16. EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA EN RAÍCES DE COMBINACIONES DE PORTAINJERTOS SOMETIDOS POR 10 DÍAS DE TRATAMIENTO POR HIPOXIA.....	49

FIGURA 17. ESQUEMA RESUMEN, DEL METABOLISMO DE LA SACAROSA EN HOJAS Y RAÍCES DE COMBINACIONES DE MARIANA 2624 (M26) Y MAZZARD F12/1 (F12) EN RESPUESTA A HIPOXIA. ....	64
FIGURA 18. CURVAS DE CALIBRACIÓN. ....	75
FIGURA 19. ESTADO DE MUESTRAS EN CADA PASO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN.....	75
FIGURA 20. MUESTRAS DETERIORADAS. ....	76
FIGURA 21. CLADOGRAMA PARA SACAROSAS SINTASAS, INVERTASAS Y HEXOQUINASAS ENCONTRADAS EN MAZZARD F12/1 Y MARIANA 2624.....	76
FIGURA 22. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS PARA INV ALCANINAS/NEUTRAS DE <i>PRUNUS AVIUM</i> . ....	80
FIGURA 23. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS PARA INV ÁCIDAS DE <i>PRUNUS AVIUM</i> ....	81
FIGURA 24. GELES DE AGAROSA 1% POSTERIOR A SÍNTESIS DE CDNA CON GEN DE REFERENCIA	84
FIGURA 25. TASA FOTOSINTÉTICA DE COMBINACIONES DE HOMO Y HETEROINJERTOS ENTRE MARIANA 2624 (M26) Y MAZZARD F12/1 (F12).....	84

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1. MATERIAL VEGETAL UTILIZADO. ....	14
TABLA 2. FACTORES Y NIVELES PARA ESTUDIO DE ROBUSTEZ DE LA TÉCNICA ANALÍTICA SEGÚN EL DISEÑO DE PLACKETT-BURMAN. ....	19
TABLA 3. MATRIZ USADA PARA CÁLCULO DEL EFECTO EN LA ROBUSTEZ DE LA TÉCNICA SEGÚN EL DISEÑO DE PLACKETT-BURMAN .....	20
TABLA 4. RESUMEN DE FACTORES EVALUADOS PARA LA ELECCIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS DESDE HOJAS Y RAÍCES DE <i>PRUNUS SPP</i> .....	21
TABLA 5. RESUMEN DE PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA IDENTIFICAR CARBOHIDRATOS EN <i>PRUNUS SPP</i> .....	27
TABLA 6. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS, CURVAS DE CALIBRACIÓN Y PARÁMETROS DE VALIDACIÓN PARA 4 CARBOHIDRATOS.....	29
TABLA 7. EFECTO Y ESTADÍSTICO F CALCULADO PARA LOS FACTORES ANALIZADOS EN LA ROBUSTEZ DE LA TÉCNICA. ....	31
TABLA 8. SECUENCIAS DE PARTIDORES UTILIZADOS .....	46
TABLA 9. CARACTERÍSTICAS PCR PARA CADA PARA DE PARTIDORES UTILIZADOS .....	47
TABLA 10. RESUMEN DE LAS 19 CONDICIONES DE HPLC EVALUADAS EN ESTE TRABAJO .....	74
TABLA 11. NOMENCLATURA Y SECUENCIAS PEPTIDICAS ENCONTRADAS EN LOS PORTAINJERTOS MARIANA 2624 Y MAZZARD F12/1.....	77
TABLA 12.. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE ISOFORMAS DE SACAROSA SINTASA EN P. AVIUM (MAZZARD F12/1).....	78
TABLA 13. . CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE ISOFORMAS DE SACAROSA SINTASAS EN HIBRIDO P. CERASIFERA X P. MUNSONIANA (MARIANA 2624).....	78
TABLA 14.. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE ISOFORMAS DE INVERTASAS EN P. AVIUM (MAZZARD F12/1).....	79
TABLA 15. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE ISOFORMAS DE INVERTASAS EN HIBRIDO P. CERASIFERA X P. MUNSONIANA (MARIANA 2624).....	79
TABLA 16. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE ISOFORMAS DE HEXOQUINASAS EN P. AVIUM (MAZZARD F12/1).....	82
TABLA 17. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE ISOFORMAS DE HEXOQUINASAS EN HIBRIDO P. CERASIFERA X P. MUNSONIANA (MARIANA 2624).....	82

## ABREVIACIONES

A6PR: Aldosa-6-fosfato reductasa	LD: Límite de detección
ADH: Alcohol deshidrogenasa	LDH: Lactato deshidrogenasa
ADP: Adenosina difosfato	LQ: Límite de cuantificación
ARN: Ácido ribonucleico	M26: Portainjerto Mariana 2624
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero	MDH: Malato deshidrogenasa
AST: Aspartato aminotransferasa	MeOH: Metanol
ATP: Adenosín trifosfato	N <sub>(L)</sub> : Nitrógeno líquido
CH <sub>3</sub> CN: Acetonitrilo	N <sub>2(g)</sub> : Nitrógeno gaseoso
CO <sub>2</sub> : Dióxido de carbono	NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido
CoA: Coenzima A	O <sub>2</sub> : Oxígeno
COX: Citocromo C oxidasa	PDC: Piruvato descarboxilasa
Ct: Ciclo umbral (del inglés <i>threshold cycle</i> )	PFK: Fosfofructoquinasa
Ctrl: Tratamiento Control	PGI: Fosfoglucoisomerasa
DEG: Genes con expresión diferencial	PGM: Fosflucomutasa
EtOH: Etanol	R <sup>2</sup> : Coeficiente de correlación lineal
F12: Portainjerto Mazzard F12/1	ROS: Especie reactiva de oxígeno
G6P: Glucosa 6-fosfatasa	SCS: Succinil CoA-ligasa
GABA: Ácido $\gamma$ -aminobutírico	SOT: Transportador de sorbitol
GAD: Ácido glutámico	SPP: Sacarosa fosfatasa
GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	SPS: Sacarosa fosfato sintasa
GDH: Glutamato deshidrogenasa	SDH: Sorbitol deshidrogenasa
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución	SnRK1: Proteína quinasa 1 no relacionada con la fermentación de la sacarosa
INV: Invertasa	SUS: Sacarosa sintasa
IR: Índice de refracción	$\alpha$ TPS: $\alpha$ -trehalosa fosfato sintasa

## RESUMEN

La utilización de portainjertos en agricultura ha permitido aumentar la eficiencia de la producción frutícola, mediante la selección de portainjertos tolerantes a diversos estreses, como aquel por hipoxia radical que puede producir cambios fenotípicos, metabólicos y anatómicos, causando finalmente una crisis energética en la planta injertada. Se han caracterizado portainjertos en especies de carozos del género *Prunus* spp., siendo descrito como tolerante el ‘Mariana 2624’ - M26 y sensible el ‘Mazzard F12/1’ - F12 a hipoxia radical.

En el presente trabajo se evaluaron ambos portainjertos, sensible y tolerante a la hipoxia combinados entre ellos, cuantificándose glucosa, fructosa, sacarosa y sorbitol, mediante HPLC-IR, en hojas y raíces, además se determinó la expresión génica de cDNA, para 3 isoformas de sacarosas sintasas (SUS), 1 invertasa (INV) y 1 hexoquinasa (HK), mediante qPCR, respecto al gen de la ARN polimerasa II (RPII). Los análisis realizados permitieron identificar en el metabolismo de la sacarosa, la relación entre la tolerancia y/o sensibilidad del portainjerto respecto al vástago injertado, como respuesta o consecuencia del estrés por hipoxia. A través de los resultados obtenidos se determinó que una menor concentración de sacarosa y sorbitol está presente en raíces de M26 respecto a F12, sin diferencias significativas de las concentraciones en hojas. Mientras que las concentraciones de hexosas en todas las combinaciones se mantienen o aumentan en hoja y se mantienen o disminuyen en raíces. Además, en raíces, por un lado, la sobreexpresión de INVv2 para las 4 combinaciones, y por otro la represión de las 3 SUS analizadas en M26 y de 2 SUS en F12. No se observaron cambios para HK3 en todas las combinaciones. Mientras que, en hojas, se

sobrexpresó INVv2 en las combinaciones heteroinjertos, junto con la sobreexpresión de SUS en hojas de F12, por otro lado, se determinó la represión de 2 SUS en M26 y sobreexpresión de HK3 en hojas de F12 injertadas sobre M26.

A partir de los resultados obtenidos se puede inferir que ocurre la translocación de sacarosa y/o sorbitol desde hojas a raíces, dados por la comunicación entre el vástago injertado y el portainjerto, según la tolerancia o sensibilidad de este último al estrés por hipoxia. En conclusión, las raíces del genotipo tolerante (M26), son más económicas energéticamente, respecto al genotipo sensible (F12).

## **ABSTRACT**

The use of rootstocks in agriculture has made it possible to increase the efficiency of fruit production through the selection of rootstocks tolerant to various stresses, such as radical hypoxia, which can produce phenotypic, metabolic and anatomical changes, ultimately causing an energy crisis in the grafted plant. Rootstocks have been characterized in stone species of the genus *Prunus* spp. and 'Mariana 2624' - M26 has been described as tolerant and 'Mazzard F12/1' - F12 as sensitive to radical hypoxia.

In the present work, both rootstocks, sensitive and tolerant to hypoxia combined between them, were evaluated, quantifying glucose, fructose, sucrose and sorbitol, by HPLC-IR, in leaves and roots, in addition the gene expression of cDNA was determined, for 3 isoforms of sucrose synthases (SUS), 1 invertase (INV) and 1 hexokinase (HK), by qPCR, with respect to the RNA polymerase II (RPII) gene. The analyses performed made it possible to identify the relationship between the tolerance and/or sensitivity of the rootstock with

respect to the grafted scion in sucrose metabolism, as a response to or consequence of hypoxia stress. From the results obtained, it was determined that a lower sucrose and sorbitol concentration is present in roots of M26 with respect to F12, with no significant differences in leaf concentrations. While the concentrations of hexoses in all combinations are maintained or increased in leaves and maintained or decreased in roots. Furthermore, in roots, on the one hand, overexpression of INVv2 for the 4 combinations, and on the other hand, repression of the 3 SUS analyzed in M26 and of 2 SUS in F12. No changes were observed for HK3 in all combinations. While, in leaves, INVv2 was overexpressed in the heterografted combinations, together with SUS overexpression in F12 leaves, on the other hand, repression of 2 SUS in M26 and overexpression of HK3 in F12 leaves grafted on M26 were determined.

From the results obtained, it can be inferred that sucrose and/or sorbitol translocation occurs from leaves to roots, due to the communication between the grafted scion and the rootstock, depending on the tolerance or sensitivity of the latter to hypoxia stress. In conclusion, the roots of the tolerant genotype (M26) are more energetically economical than the sensitive genotype (F12).

# INTRODUCCIÓN

## Importancia económica de la fruticultura en Chile

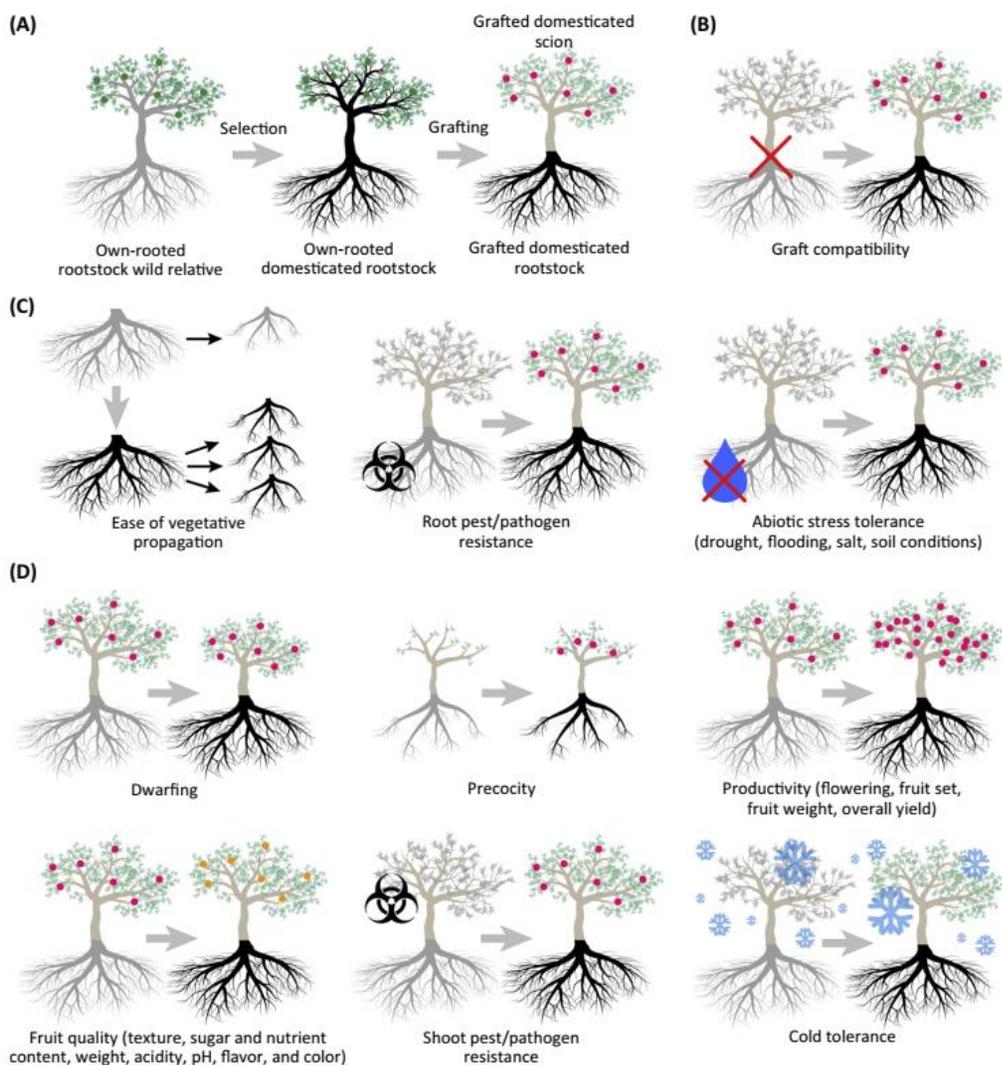
El sector silvoagropecuario, es un área económica relevante para Chile, la cual contribuyó con el 2,9% del producto interno bruto nacional en el año 2022 [1, 2, 3]. De las cuales, los carosos, aportaron en el año 2020, respecto a la superficie nacional sembrada un 11,5% en el caso del cerezo [*P. avium*], 3,7% dado por el ciruelo europeo [*P. domestica*], 2,6% por el almendro [*P. dulcis* -syn. *P. amygdalus*], 4,2% para el durazno [*P. persica*], 1,3% dado por el ciruelo japonés [*P. salicina*] y un total del 0,20% para pluot [hibrido de *P. salicina* y *P. ameniaca*], damascos [*P. ameniaca*] y guindo agrio [*P. cerasus*] todas especies del género *Prunus* [4].

Estas especies de frutales se cultivan principalmente en regiones templadas y cálidas del mundo, que presentan un suministro de agua limitado, alta irradiación y altas temperaturas estivales [5, 6]. En Chile se pueden encontrar estas características en la zona centro del país y la región del Lib. Gral. B. O'Higgins lidera la producción frutícola, con el 25,3% del territorio nacional en el rubro al 2021, y una producción de especies del género *Prunus* del 12,5% a nivel nacional [1, 3, 7].

## Injertos para agricultura

Injertar es una práctica agrícola, en la que se une un brote (vástago) de una planta a las raíces (portainjerto) de otra, obtenidos desde diferentes individuos (figura 1A) [8, 9].

Existe compatibilidad portainjerto/vástago (figura 1B) cuando se forma unión de los haces vasculares de manera sólida y duradera. Se usa como un consenso general la distancia taxonómica entre portainjerto y vástago, esto significa que el éxito teórico de una combinación particular es intraclonal > interclonal > intraespecífico > interespecífico > intragenérico > intergenérico > intrafamiliar [10].



**Figura 1. Principales características para la selección de portainjerto.** Los portainjertos utilizados en la agricultura perenne (A) han sido seleccionados de un grupo de germoplasma silvestre y mejorados por (B) su capacidad para injertarse en vástagos cultivados, (C) el fenotipo de la raíz y (D) su capacidad para impactar el fenotipo del vástago injertado. Ilustración obtenida de Warschefsky y col. (2016) [8]

El uso de portainjertos puede conferir mayor tolerancia a factores de estrés abióticos y bióticos (figura 1C), además de proporcionar ventajas técnicas y económicas a la fruticultura (figura 1D) [8]. Por ejemplo, la resistencia a enfermedades transmitidas, y tolerancia contra estreses abióticos, tales como, salinidad, suelos húmedos y temperaturas altas o bajas, permitirían mejorar la absorción de agua y nutrientes, así como, la eficiencia en el uso de estos nutrientes, además extender la duración del tiempo de cosecha y mejorar la calidad de la fruta. Por tanto, el uso de portainjertos permite mejorar la productividad, adaptabilidad y reducir costos productivos de algunas especies agrícolas, y, por lo tanto la utilización de portainjertos se transforma en un mecanismo valioso para mejorar y expandir el cultivo, principalmente, de especies perennes [8, 9, 11, 12, 13, 10].

En la agricultura moderna, el injerto ha aumentado considerablemente la eficiencia del mejoramiento de cultivos perennes al permitir que las características de la raíz y el vástago se seleccionen de forma independiente, en lugar de requerir que ambos conjuntos de características estén presentes en un solo individuo genético [8].

En prácticas de injerto más avanzadas, a veces se usa un tercer individuo para unir un portainjerto y un vástago denominado puente, ya que de otro modo podrían ser incompatibles [8]. Un ejemplo de este tercer individuo, en *Prunus*, es el portainjerto de ciruela “Adara”, el cual es compatible para 44 tipos de cultivares de cerezas, entre ellas se encuentra *P. avium* y *P. cerasus*, además los duraznos y nectarinas injertados en “Adara” presentan diferentes compatibilidades según el cultivar, pero una alta proporción parece ser compatible con este portainjerto, al igual que otras variedades de carozos [14].

## Hipoxia radical

Como organismos aeróbicos, las plantas requieren, que al menos el 10,0% del volumen del suelo, este compuesto de poros llenos de aire, si desciende por debajo del 12,0%, se dificulta la respiración e intercambio gaseoso; y si el oxígeno (O<sub>2</sub>) del aire en estos poros es inferior al 10,0% se desencadena hipoxia radical, mientras que en condiciones más drásticas se alcanzan condiciones de anoxia [15, 16]. Estas condiciones se pueden dar por lluvias o exceso de riego en suelos mal drenados, y/o por prácticas agrícolas, como el paso de maquinarias agrarias, desencadenando una condición de estrés y respuesta a ello [6, 12, 15, 16, 17].

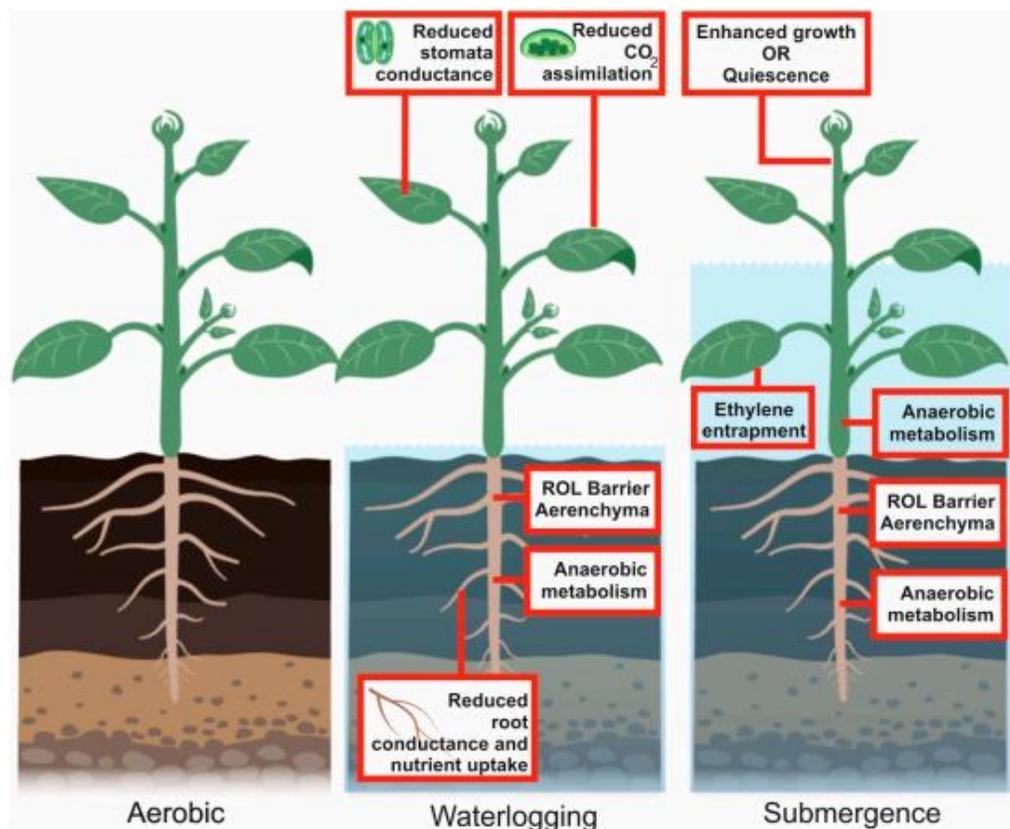


Figura 2. Cambios generados en situaciones de hipoxia radical generada por suelos inundados. Obtenido de la revisión de Loreti y Perata (2020) [18].

La raíz, es el primer órgano que percibe, y responde a este estrés, por lo que se ve seriamente dañada, afectando negativamente al crecimiento de la planta [19]. Por lo tanto, se afecta la fisiología, morfología, anatomía y metabolismo de las plantas, mediante la alteración de la expresión génica, el consumo de energía, el metabolismo celular, el crecimiento y desarrollo, la inducción del cierre estomático, disminución de clorofila, reducción de la tasa fotosintética y del potencial hídrico foliar, como se resume en la figura 2 [6, 12, 20, 21, 11].

### **Efectos de hipoxia radical en *Prunus spp.***

Los cultivares de carozos sufren disminuciones significativas en la producción y la calidad de la fruta a causa de eventos de hipoxia [6, 12, 17]. En el caso, de los portainjertos de *Prunus spp.*, se han considerado sensibles a hipoxia al comparar con membrillo, manzano y peral, que son especies de la misma familia [15, 21].



**Figura 3. Fenotipos representativos de los siete genotipos analizados después de 14 días de tratamiento de anegamiento. W, plantas encharcadas (4 cm de agua sobre el suelo); C, plantas de control. (a) 'Mariana 2624, (b) 'Cab6P', (c) 'Maxma 14 , (d) 'Colt', (e) 'Garnem', (f) 'Maxma 60 y (g) 'Mazzard F12/1. Obtenido de Pimentel y col. (2014) [21]**

Al someter a hipoxia los portainjertos de *Prunus spp.*, se han observado síntomas fenotípicos de marchitez, clorosis y rizado de las hojas en especies sensibles [17]. Sin embargo, en 2014, se reportó un gradiente de tolerancia al estrés por hipoxia radical, al evaluar la respuesta de 7 especies de portainjertos de *Prunus spp.*, los que se muestran en la figura 3 [21]. Se identificó que el portainjerto de ciruelo, un híbrido de *P. cerasifera*  $\times$  *P. munsoniana*, denominado “Mariana 2624” (M26), y el portainjerto de cerezo, de la especie *P. avium*, denominado “Mazzard F12/1” (F12), son genotipos contrastantes al estrés, siendo estos los extremos más tolerante y sensible, respectivamente [12, 21]. Las diferencias en la tolerancia y sensibilidad entre los genotipos, sugiere que, dentro del mismo género, han evolucionado con diferentes estrategias para hacer frente al estrés, y, por tanto, la característica de tolerancia está determinada por el portainjerto [12, 21].

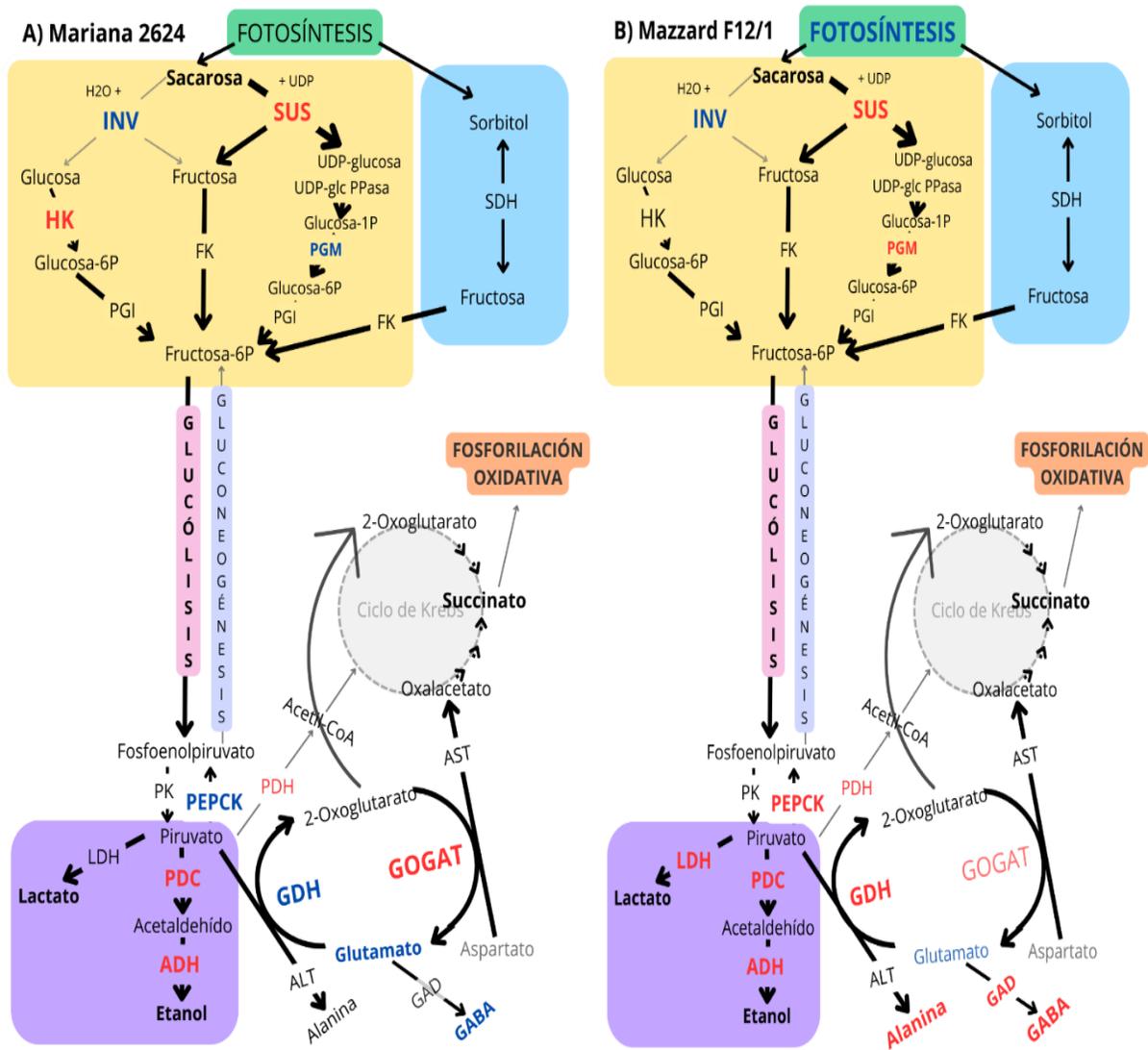
A nivel anatómico, algunas plantas leñosas, que se adaptan a hipoxia, desarrollan lenticelas hipertróficas y/o aerénquima radical, para aumentar la aireación [18, 22]. Se ha reportado que se forma tejido aerenquimático, en portainjertos *Prunus spp.* tolerantes al estrés hipóxico [21, 20]. El tejido aerenquimático es un tejido vegetal característico de plantas acuáticas [23]. Este tejido facilita la difusión de O<sub>2</sub> desde la atmosfera hacia las raíces, así como la difusión de sustancias tóxicas en la dirección opuesta, como el etileno, el cual al quedar atrapado en las raíces, se involucra en la respuesta a hipoxia favoreciendo el metabolismo anaeróbico [24, 12, 20, 23, 18, 22].

## **Metabolismo asociado a estrés por hipoxia**

El cierre de estomas en estrés por hipoxia (figura 2), impide el equilibrio entre pérdida/absorción de agua y gases [22]. Los portainjertos de *Prunus spp.* sometidos a hipoxia, han demostrado, que la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> y la conductancia estomática, disminuye severamente en el genotipo sensible, lo que causa reducción de la fotosíntesis de hasta 65% [21, 17]. Esto conlleva reducción de respiración aeróbica, causando una “crisis energética”, que es gatillada cuando la producción de energía a través de citocromo C oxidasa (COX), traducida en adenosín trifosfato (ATP) por la ATP sintasa, cae a un punto en el que es necesario activar mecanismos menos eficientes de producción de energía, como la fermentación anaeróbica (figura 4) [25, 19, 20, 26, 27, 28].

En el portainjerto M26, se ha evidenciado que la concentración intracelular de CO<sub>2</sub> y la tasa de transpiración aumentan de manera transitoria, presentando niveles de fotosíntesis y conductancia estomática similares a plantas bien aireadas [21]. Además, se ha demostrado que presentan menor demanda de ATP para el recambio de proteínas y el mantenimiento de la integridad de las membranas, lo que se relaciona, con bajos costos energéticos para su mantenimiento y, a pesar, de estar en condiciones de hipoxia radical, en ellos se ha visto que son capaces de proporcionar reservas de carbohidratos [20, 15].

El suministro de azúcares solubles se correlaciona con la producción de ATP, por tanto, el nivel de reservas de carbohidratos y/o la capacidad de mantener su transporte, parece ser una característica clave en la tolerancia a la hipoxia a largo plazo [15]. La glucólisis acoplada a fermentación, utiliza azúcares para producir lactato y etanol (figura 4) [16, 19, 20].



**Figura 4. Reconfiguración metabólica bajo estrés por deficiencia de O<sub>2</sub> en plantas.** La menor disponibilidad de O<sub>2</sub> altera el metabolismo para maximizar la producción de ATP a nivel de sustrato. El modelo representa los principales cambios conocidos, que incluyen el aumento del metabolismo de la sacarosa (cuadro amarillo) y el almidón, la glucólisis (rosado), la fermentación (morado), un flujo modificado del ciclo de Krebs, una derivación hacia alanina, 2-oxoglutarato y ácido g-aminobutírico (GABA). Flechas y letras en negritas indican las vías potenciadas durante el estrés, flechas y letras en gris indican las reacciones que se inhiben durante el estrés, según Bailey-Serres y col. (2012) [29]. Letras rojas indica sobreexpresión o aumento, letras azules indican represión o disminución, ambos en análisis mediante transcriptómica resumidos en Salvatierra y col. (2020) [17, 15]. Mediante resultados de conductancia estomática y razón fotosintética obtenidos por Pimentel y col. (2014) se deduce mantenimiento del proceso fotosintético en Mariana 2624 (A) y disminución del mismo en Mazzard F12/1 (B) [21]. Las abreviaturas son las siguientes ADH, alcohol deshidrogenasa; GAD, glutamato descarboxilasa; GDH glutamato deshidrogenasa; INV, invertasa; LDH, lactato deshidrogenasa; PDC, piruvato descarboxilasa; SUS, sacarosa sintasa; HK, hexoquinasa; PGI, fosfogluco isomerasa; PGM, fosfoglucomutasa; FK, fructosaquinasa; SDH sorbitol deshidrogenasa; UDP-glc PPasa; UDP-glucosa pirofosforilasa; PK, piruvatoquinasa; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; ALT, alanina aminotransferasa; PDH, piruvato deshidrogenasa; GOGAT, glutamato sintasa; AST, aspartato aminotransferasa.

En portainjertos de cítricos, y en raíces de álamos, se ha evidenciado que los genes de *piruvato carboxiquinasa (PDC)* y *alcohol deshidrogenasa (ADH)*, enzimas claves en fermentación, se ven activadas en hipoxia (figura 4) [29, 19, 30, 31]. Así mismo, se ha demostrado que los transcritos de *PDC* y *ADH* se inducen de forma coordinada en M26 y F12 en condiciones de deficiencia de O<sub>2</sub>, aunque M26, mostró una tendencia a la baja tras 6 horas de hipoxia [17, 15]. Este hallazgo transcripcional sugiere que M26 recurre a otros mecanismos de adaptación, distintos de las vías de fermentación, después de las primeras horas de hipoxia, siendo en general la vía glucolítica la principal fuente de energía bajo hipoxia [15, 19]. Una de estas vías es a través de la *lactato deshidrogenasa (LDH)*, para la cual se ha evidenciado, en *Persea americana*, *Prunus spp.* y *C. sachalinenses*, que se produce la inducción de este gen [15, 32, 31, 17].

Asimismo, se ha reportado en *Persea americana*, *Vitis vinifera* y portainjerto de *Prunus spp.* en hipoxia, ausencia de transcritos para *glucosa 6- fosfatasa (G6P)*, *fructosa 1,6- bifosfatasa (FBP)* y *fosfoglucomutasa (PGM)* genes asociados a la gluconeogénesis [33, 34, 15]. Particularmente, mediante estudios transcriptómico, en M26, se reprimieron 2 isoformas de *PGM* durante hipoxia, mientras que en F12, luego de 72 hrs. de deficiencia de O<sub>2</sub>, se observa inducción de 2 isoformas de *PGM* [17]. Además, los genes que codifican para *fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK)* repitieron el comportamiento descrito para la *PGM* para los portainjertos de *Prunus* [17].

Los principales carbohidratos obtenidos desde la fotosíntesis en *Prunus spp.* son sacarosa y sorbitol, los que son transportados desde las hojas hacia otros órganos de la planta [35, 36]. El sorbitol es sintetizado en las hojas, por aldosa-6-fosfato reductasa (A6PR),

mientras que, para las células radicales, se obtienen a través del citosol mediante el transportador de sorbitol (SOT), y puede ser hidrolizado, a fructosa, por la sorbitol deshidrogenasa (SDH) [35].

Por otro lado, la sacarosa, es un disacárido conformado por glucosa y fructosa, la cual se sintetiza por la sacarosa-fosfato sintasa (SPS) y la sacarosa-fosfatasa (SPP) [35, 37]. Este azúcar es transportado desde las células fotosintéticas que se encuentran en las hojas, a través del floema, hasta los tejidos sumideros para su desarrollo y crecimiento [35, 37, 38, 36]. La sacarosa puede ser degradada a sus monómeros mediante invertasas (INV) de pared celular o mediante INV ácidas de la vacuola, donde se regula la turgencia y expansión de las células, para promover el crecimiento de las raíces [35]. Por otro lado, las sacarosa sintasas (SUS) metabolizan la sacarosa en fructosa y uridina difosfato (UDP)-glucosa, la cual desempeñan un papel importante en la provisión de azúcar durante eventos de hipoxia [39, 19, 15].

Mediante un estudio transcriptómico del año 2015, se evidenció que en F12, se sobrexpresaron 4 isoformas de *SUS* en condiciones de hipoxia, 1 isoforma *INV* después de 72 hrs. de tratamiento de hipoxia, sin embargo, 4 isoformas *INV* fueron reprimidas al mismo tiempo [17]. Por otra parte, en el tolerante, M26, presentó una disminución de la expresión transcripcional de 3 isoformas de *INV* durante las 24 y 72 hrs. de tratamiento [17]. Por lo tanto, las plantas que favorecen la actividad de *SUS*, optan por una forma más eficiente energéticamente para proporcionar sustratos para la glucólisis en condiciones de hipoxia, como se muestra en la figura 4 [15].

Los monómeros resultantes de la reacción de *INV*, son fosforilados en el sexto carbono a través de hexoquinasas (HK) y fructoquinasas (FK), respectivamente [40, 35]. Mientras

que la UDP-glucosa, producto de SUS, es sustrato para UDP-glucosa pirofosforilasa (UDP-glc PPasa) junto a fosfato inorgánico (PPi) catalizándolos a glucosa 1-fosfato y UTP [35].

Las HK son las únicas enzimas vegetales capaces de fosforilar glucosa, por lo que se considera una de las enzimas claves en la activación de la glucólisis [15, 17]. Aún más, la actividad de las HK ha sido asociada con la regulación de procesos fisiológicos, como el cierre de estomas, la fotosíntesis en las hojas y la absorción de minerales en las raíces [17]. Procesos que son afectados en condiciones de hipoxia radical.

Por lo tanto, Arismendi y col. (2015) analizaron sus patrones transcripcionales para los portainjertos de M26 y F12 utilizando como comparación el genoma de *P. persica*, donde hallaron 7 *HK* y 8 *FK* [17]. De los cuales, *HK3* (*Prupe.1G366000*) se sobreexpresó ante el estrés por hipoxia en el genotipo tolerante (M26), pero no en el genotipo sensible (F12) [41]. Curiosamente, se ha descrito que, un tipo de *HK3*, en células de mamíferos es regulada por hipoxia y ejerce efectos protectores contra el estrés oxidativo, tal vez aumentando los niveles de ATP, reduciendo la producción de ROS inducida por oxidantes, preservando el potencial de la membrana mitocondrial y aumentando la biogénesis mitocondrial [17].

## **OPORTUNIDAD DE INVESTIGACIÓN**

En resumen, la fruticultura actual requiere de portainjertos que incorporen características como las que se muestran en la figura 1, lo que conforma un complejo idiotipo y un gran reto para la agricultura [42]. Es en este contexto, y considerando que frente estrés por hipoxia radical, se producen carencia de fosforilación oxidativa, siendo menos eficiente en términos energéticos (figura 4) cabe preguntarse, si el sistema aéreo, en una planta injertada es capaz de mantener la distribución basal de azúcares solubles hacia el portainjerto en condiciones de hipoxia, y si la condición de tolerancia, que presenta M26, está dada porque el portainjerto presenta menor requerimiento de ATP y azúcares para mantener el metabolismo basal, en comparación con su contraparte sensible, favoreciendo la sobrevida del injerto.

## **HIPÓTESIS**

El portainjerto de *Prunus sp.* “Mariana 2624”, tolerante a hipoxia radical, tiene menor requerimiento energético en comparación a su contraparte sensible, “Mazzard F12/1”, permitiendo la sobrevida de la planta injertada.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Analizar la respuesta de la combinación vástago/portainjerto y su relación con la disponibilidad de glucosa, fructosa, sacarosa y sorbitol, así como la expresión génica de sacarosa sintasas, invertasa y hexoquinasa en respuesta a deficiencia de O<sub>2</sub> radical utilizando dos genotipos de portainjertos contrastantes al estrés (Mazzard F12/1 – sensible y Mariana 2624 – tolerante) injertados entre sí.

### **Objetivos Específicos**

1.- Cuantificar y comparar concentraciones de glucosa, fructosa, sacarosa y sorbitol en hojas y raíces pertenecientes a combinaciones de Homo y Hetero injertos entre los portainjertos sensible (Mazzard F12/1) y tolerante (Mariana 2624), en respuesta a deficiencia de O<sub>2</sub> radical.

2.- Determinar tendencia en expresión génica de tres sacarosas sintasas, una invertasa y una hexoquinasa, en hojas y raíces de combinaciones de Homo y Hetero injertos entre los portainjertos “Mazzard F12/1” y “Mariana 2624”, en respuesta a 10 días en hipoxia radical.

3.- Identificar, de forma preliminar, la relación entre expresión génica de sacarosa sintasas, invertasa y hexoquinasa con sus respectivos sustratos y/o productos presentes en hojas y raíces de portainjertos contrastantes al estrés por deficiencia de O<sub>2</sub> radical injertados entre sí.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizó portainjertos de *Prunus spp.* clonales de 1 año, de los genotipos “Mariana 2624” (híbrido *P. cerasifera* × *P. munsoniana* – M26) y “Mazzard F12/1” (*P. avium* – F12); previamente caracterizados como tolerante y sensibles a hipoxia, respectivamente, por Pimentel y cols. (2014) [21]. Las plantas se injertaron para formar combinaciones de homo y heteroinjertos resumidos en la Tabla 1. Se utilizó el portainjerto “Adara” como puente, para favorecer compatibilidad entre las especies [14, 43].

**Tabla 1. Material vegetal utilizado.**

Combianción	Portainjerto*	Vástago**	Nombre en este trabajo
Homoinjerto	Mariana 2624	Mariana 2624	Homo M26
	Mazzard F12/1	Mazzard F12/1	Homo F12
Heteroinjerto	Mariana 2624	Mazzard F12/1	Hetero M26
	Mazzard F12/1	Mariana 2624	Hetero F12

Se resume las combinaciones entre portainjertos, injertados sobre sí. \*Sistema de raíces. \*\*Sistema aéreo.

### Tratamiento de hipoxia y colecta

El tratamiento de hipoxia se realizó sumergiendo las plantas en baldes individuales con agua tratada con nitrógeno gaseoso ( $N_{2(g)}$ ) hasta tener concentración de 4 mg/L de  $O_2$  disuelto, monitoreado semanalmente. Las plantas en condición normoxia (control) se regaron 3 veces por semana. Se usaron 36 plantas por cada combinación [21].

Se colectaron raíces y hojas de las combinaciones de homo y heteroinjertos para ambos tratamientos (control e hipoxia), las que se congelaron con nitrógeno líquido ( $N_{(L)}$ ), y almacenaron a  $-80^{\circ}C$  hasta su procesamiento. Se realizaron colectas a 6, 10 y 15 días posterior al inicio del tratamiento de hipoxia, para ambos tratamientos.

## **Equipos**

Se usaron los siguientes equipos: cromatógrafo líquido de alta definición (HPLC) marca Shimadzu, modelo Nexera serie 40 con detector de índice de refracción (IR) y Software LabSolutions LC Workstation, Microcentrífuga Thermo Scientific Pico 17, Baño de agua WNB/WNE/WPE marca Memmert, Sistema concentrador de vacío integrado Savant SpeedVac DNA120, termociclador ARIA Mx, espectrofotómetro Infinite 200 Pro MNano.

## **Validación de metodología analítica para identificación y cuantificación de carbohidratos en *Prunus spp.***

### **Selectividad o especificidad de la técnica**

Para identificar glucosa, fructosa, sorbitol y sacarosa, se utilizaron estándares disueltos en acetonitrilo/agua ( $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ) 1:1 grado HPLC, considerando manitol y maltosa como posibles interferentes. Con ellos se obtuvo los tiempos de retención ( $T_R$ ).

Se realizaron modificaciones de las condiciones de cromatografía donde se probaron parámetros como la cantidad de volumen de inyección el tipo de pre-columna y columna, proporción de fase móvil, flujo y temperatura horno y detector, con lo que se evaluó la forma del pico cromatográfico, tanto para multi estándares como para cada analito independientemente.

Además, utilizando mezclas de estándares con concentración conocida, se calculó la resolución ( $R_s$ ) entre los picos cromatográficos considerando los  $T_R$  y el ancho de la base del pico ( $W$ ) para dos picos cromatográficos contiguos (a y b), calculándose la  $R_s$  como se

muestra en la ecuación 1. Según literatura se considera buena  $R_s$ , a valores iguales o superiores a 1,5 [44].

$$\text{[EC. 1. RESOLUCIÓN]} \quad R_s = 2 \frac{TR_b - TR_a}{W_a + W_b}$$

Mediante los cromatogramas generados por los multi estándar se calculó con la ecuación 2, el número de platos teóricos (N) corregido por el tiempo muerto (TM) para la columna ultra amino y NH<sub>2</sub>P40-3E [45].

$$\text{[EC. 2. NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS]} \quad N = 16 \left( \frac{TR_a}{W_a} - TM \right)^2$$

### **Linealidad**

Se utilizaron estándares de soluciones patrón de 0,5 M para Glucosa, Fructosa, Sacarosa y Sorbitol, disueltas en acetonitrilo/agua 1:1 grado HPLC, a partir de estos se generó una curva multi estándar de concentración 200 g/L, a la cual se le realizaron 7 diluciones seriadas con un factor de dilución (FD) 2. Se calculó la regresión lineal mediante el algoritmo del programa GraphPad Prism versión 8.0.2, considerando la concentración como variable independiente y la señal analítica como variable dependiente.

### **Precisión y exactitud**

La precisión y exactitud de la técnica se calculó inyectando al menos 5 veces una solución multi estándar de 0,1 M, la cual se interpoló en la regresión lineal.

Con las concentraciones obtenidas se calculó la desviación estándar relativa (%DS – ecuación 2) para repetibilidad (r - mediciones de un mismo día) y reproducibilidad (R - mediciones de días diferentes). Con esto se calculó el cociente r/R, considerando valores

mayores a 2 como un método muy personal y valores inferiores a 1,5 un método con repetibilidad pobre [44].

$$\text{[EC. 3 DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA]} \quad \%DS = \frac{\sigma}{X} * 100$$

Donde  $\sigma$  corresponde a la desviación estándar de las mediciones y X es el promedio de las concentraciones.

De la misma manera se calculó el error estándar relativo (%E - ecuación 4) y el porcentaje de recuperación (%R – ecuación 5) aceptando como valor verdadero la concentración estimada de los analitos en la solución multi estándar.

$$\text{[EC. 4 ERROR ESTÁNDAR RELATIVO]} \quad \%E = \frac{|V_{ob}-V_R|}{V_{ob}} * 100$$

$$\text{[EC. 5 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE LA TÉCNICA]} \quad \%R = \frac{V_{ob}}{V_R} * 100$$

Donde,  $V_{ob}$  es el promedio de las concentraciones medidas y  $V_R$  es el valor aceptado como verdadero (0,1 M en este caso).

## **Sensibilidad**

La sensibilidad de calibración está dada por la pendiente (m) de la curva de calibración, la cual se obtiene a partir de la regresión lineal, o bien, mediante la ecuación 6. Mientras que la sensibilidad analítica (s) está dada por la ecuación 7.

$$\text{[EC. 6 SENSIBILIDAD DE CALIBRACIÓN]} \quad m = \frac{\Delta \text{señal analítica}}{\Delta \text{concentración}}$$

$$\text{[EC. 7 SENSIBILIDAD ANALÍTICA]} \quad s = \frac{m}{\sigma} \text{ con } \sigma: \text{ desviación estándar.}$$

Las concentraciones mínimas que se pueden identificar y cuantificar para cada analito se determinaron en base al límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LQ), los

que fueron calculados según Quattrochi y col. (1992) [44]. Para ello se midió, al menos 3 veces, 3 soluciones multi estándar de concentraciones igual e inferiores a 0,391 g/L, con las que se generó la regresión lineal entre la concentración del blanco ( $C_{bl}$ ) versus la señal analítica, de la cual se obtuvo la señal analítica si  $C_{bl}$  fuera cero. Luego, con la  $\sigma$  para cada punto de esta recta, se calcula la regresión lineal entre la  $C_{bl}$  y la  $\sigma$  de la señal analítica, la cual se extrapola a cero para obtener la desviación estándar blanco ( $\sigma_{bl}$ ).

Finalmente con el origen de la ordena del blanco ( $a_{bl}$ ) de la primera regresión, la  $\sigma_{bl}$  de la última regresión y la  $m$  de la curva de calibración se calculan el LD y el LQ según las ecuaciones 8 y 9, respectivamente.

$$[\text{EC. 8 LÍMITE DE DETECCIÓN}] \quad LD = \frac{a_{bl} + 3 \cdot \sigma_{bl}}{b}$$

$$[\text{EC. 9 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN}] \quad LQ = \frac{a_{bl} + 10 \cdot \sigma_{bl}}{b}$$

### **Robustez de la técnica**

La estimación de la robustez analítica se realizó mediante los diseños de Plackett – Burman para 6 combinaciones de parámetros analíticos [44, 46]. Así se asignaron niveles a las características del parámetro analítico que en la Tabla 2 se denomina factor (letra mayúscula), donde se consideró como nivel 0 (cero) las condiciones indicadas en Foitzich (2013) [47].

**Tabla 2. Factores y niveles para estudio de robustez de la técnica analítica según el diseño de Plackett-Burman.**

Factor	-4	-3	-2	-1	0	1	2
A: Diámetro Pre-columna (mm) **				4,0	N/A	3,0	
B: Columna (tamaño partícula (µm); diámetro x longitud (mm)) *				3; 4,6x150	5; 4,6x250	4; 3,0x250	
C: Proporción acetonitrilo/agua (v/v)		2.9375	3.142361	3.347222	3.470139		
D: Flujo (ml/min)	0,25	0,35	0,4	1,0	1,2	1,4	
E: Temperatura horno y detector (°C)					30	40	45
F: Volumen de inyección (µl)				10	20		

\*El nivel -1 corresponde a la columna ultra amino de Restek, 0 a Puropher STAR-NH2 de Merck y +1 a NH2P-40 3E de Shodex. \*\* El nivel -1 corresponde a la pre-columna ultra amino de Restek, el nivel 0 al análisis sin pre-columna y el +1 a la pre-columna NH<sub>2</sub>P-50G 3A.

Luego, se calculó el efecto del factor sobre la robustez, mediante la ecuación 10, con la información que se resume en la Tabla 3, en donde, cada fila representa un experimento, mientras que, en las columnas se indica el nivel asociado al factor usado en el experimento. Se evaluó la significancia estadística de los efectos calculados mediante análisis de varianza (ANOVA) y test F con  $\alpha=0,05$  [46, 44].

$$[\text{EC. 10 EFECTO DEL FACTOR}] \quad E = \frac{2[\sum(\%R+) - \sum(\%R-)]}{N}$$

Donde %R corresponde al %R calculado según la ecuación 4 y los signos +/- representan los niveles, los cuales se multiplican y N corresponde al número de experimentos, aquí son 6.

**Tabla 3. Matriz usada para cálculo del efecto en la robustez de la técnica según el diseño de Plackett-Burman**

Condición de HPLC	A	d1	B	C	D	E	F	%R Fructosa	%R Glucosa	%R Sacarosa	%R Sorbit
1: C5	-1	1	-1	-2	-1	1	0	256,8%	241,2%	221,6%	185,1%
2: C12	-1	1	1	-1	-2	1	0	81,1%	92,1%	83,6%	87,3%
3: C15	1	1	1	-1	-3	2	0	79,2%	139,9%	107,0%	85,2%
4: C16	1	1	1	0	-3	2	-1	131,8%	195,3%	162,7%	132,8%
5: C18	0	1	1	0	-4	2	-1	99,8%	277,6%	119,2%	98,3%
6: C19	+1/0	1	1	0	-3/-4	2	-1	96,5%	107,6%	120,3%	99,6%

Letras mayúsculas representa el factor de la Tabla 2, d1 se considera una variable muda (dummies). Los cálculos se realizaron según [46].

### **Implementación del método de extracción de azúcares en hojas y raíces**

Se evaluaron 8 métodos de extracciones de azúcar, los cuales se basaron principalmente en la diferencia de polaridad en los solventes, donde las extracciones, que utilizaron un solvente acuoso, se denominaron P1, así las extracciones en base a alcohol se denominaron P2, cada método se resume en la Tabla 4.

Para las extracciones P2.4 y P2.5 (Tabla 4), se utilizó previamente un multi estándar 0,1M y luego muestras de hojas y raíces, con el fin de evaluar la purificación mediante resina “Bond Elunt – NH<sub>2</sub>”, 200 mg/3ml marca Agilent, con el cual se realizó un acondicionamiento con 2 volúmenes CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 1:1 y 2 volúmenes H<sub>2</sub>O, se aplicó 1 volumen de muestra, se lavó con 2 volúmenes de H<sub>2</sub>O y 2 volúmenes CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 1:1

**Tabla 4. Resumen de factores evaluados para la elección de una metodología de extracción de carbohidratos desde hojas y raíces de *Prunus spp.***

Código extracción	Muestra Hoja (mg)	Muestra Raíz (mg)	Solvente	T° utilizadas	Velocidad y tiempo de centrifugación	T° speed-vac	Filtro y/o resina	Volumen final	Volumen inyectado
P1.1	F12 sequía 6H H3 ~100 mg	F12 ctrl 3H R3 ~100 mg	1 ml H2O	Baño de agua a 50°C x 15 min.	10000xg por 15 min	N/A	Filtro 0,22 µm	1,5 ml	20 µl
P1.2	F12 sequía 6H H3 ~200 mg	F12 CTRL 3H R3 ~300 mg M26 CTRL 3H R3 ~300 mg	1 ml H2O	Baño de agua a 50°C x 15 min.	10000xg por 15 min	45°C por 1 hr y 65°C por 1 hr.	N/A	0,3 ml	20 µl
P2.1	F12 sequía 6H H3 ~100 mg	F12 ctrl 3H R3 ~100 mg	1 ml MeOH 2 veces 500 µl metanol 50%	Ambiente	3 veces a 10000xg por 15 min	65°C por 15 min.	N/A	0,5 ml	20 µl
P2.2	F12 sequía 6H H3 ~200 mg	F12 CTRL 3H R3 ~400 mg M26 CTRL 3H R3 ~400 mg	1 ml MeOH 1 ml MeOH 50% 1 ml MeOH 30%	Ambiente	3 veces a 10000xg por 15 min	45°C por 1,5 hrs 65°C por 40 min, 45°C por 1 hr y 65°C por 1 hr.	N/A	0,3 ml	20 µl
P2.3	M26 calor 1d T1 y M26 calor 1d T2 ~500 mg	M26 CAT 3H R1 Water M26 7d R2 ~500 mg	2 veces 2 ml MeOH 2 ml MeOH 50% 2 ml MeOH 30%	Ambiente	10000xg por 15 min 2 veces 7000xg por 15 min 2 veces 10000xg por 5 min	45°C por 30 min 65°C hasta sequedad	N/A	1 ml	20 µl
P2.4	F12 frío 1d H3 ~100 mg	F12 frío 1d R3 ~100 mg	0,75 ml EtOH 80% 2 veces 0,75 ml EtOH 50%	Solventes a 80°C	4 veces a 4800xg por 10 min	45°C por 1,5 hr.	Bond Elut NH2	1 ml	10 µl
P2.5	F12 frío 1d H3 ~100 mg	F12 frío 1d R3 ~100 mg	0,75 ml MeOH 80% 2 veces 0,75 ml MeOH 50%	Solventes a 80°C	4 veces a 4800xg por 10 min	45°C por 1,5 hr.	Bond Elut NH2	1 ml	10 µl
P2.6	F12 frío 1d H3 ~100 mg	F12 frío 1d R3 ~100 mg	0,75 ml MeOH 80% 2 veces 0,75 ml MeOH 50%	Solventes a 80°C	4 veces a 4800xg por 10 min	45°C por 1,5 hr.	Filtro 0,22 µm	0,5 ml	10 µl
P2.7	F12 frío 1d H3 ~100 mg	F12 frío 1d R3 ~100 mg	0,75 ml MeOH 80% 2 veces 0,75 ml MeOH 50%	Solventes a 80°C	4 veces a 4800xg por 10 min	45°C por 1,5 hr.	Filtro 0,22 µm	0,5 ml	10 µl
P2.8	F12 frío 1d H3 ~200 mg	F12 frío 1d R3 ~200 mg	0,75 ml MeOH 0,75 ml MeOH 80% 2 veces 0,75 ml MeOH 50%	Solventes a 60°C	4 veces a 4800xg por 10 min	65°C por 2 hrs.	Filtro 0,22 µm	0,5 ml	10 µl

Tanto el agua como el metanol utilizado eran grado HPLC, mientras que el etanol era grado técnico sin filtrar.

### **Efecto matriz**

Se evaluó el efecto matriz sobre la técnica, mediante la extracción realizada en muestras de raíces y hojas fortificadas con 0,1 M de estándar de glucosa, fructosa, sacarosa y sorbitol, utilizando como control el mismo material vegetal, sin fortificar. Con las concentraciones obtenidas se calculó, el %DS, %E y %R, mediante las ecuaciones 2, 3 y 4, respectivamente. Considerando en este caso que  $V_{ob}=C_F-C_V$ , donde  $C_F$  es la concentración del analito medida en la muestra fortificada;  $C_V$  es la concentración del analito medida en la muestra sin fortificar; y  $V_R$  es la concentración de analito adicionada, es decir, 0,1 M.

### **Cuantificación de carbohidratos en hojas y raíces**

Se realizó la extracción mediante P2.8 de la Tabla 4. A partir del material vegetal molido, congelado en nitrógeno líquido y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se masaron 600 mg raíces por duplicado y 300 mg hojas.

Estas se homogenizaron con 0,75 ml de: metanol absoluto, metanol 80% y dos veces con metanol 50% a  $65^{\circ}\text{C}$  cada uno, luego de cada homogenización, se centrifugó a 4800xg por 10 min a temperatura ambiente. Para el siguiente paso de metanol, se utilizó el precipitado, mientras que los sobrenadantes se recolectaron, luego de cada centrifugación. En el caso de las raíces se juntaron los sobrenadantes de los duplicados.

Los sobrenadantes se filtraron con filtro de jeringa de  $0,22\ \mu\text{m}$  y se concentraron en speed-vac a  $65^{\circ}\text{C}$  hasta obtener un volumen final de 250  $\mu\text{l}$ , los cuales se homogenizaron con 250  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo. Esta solución se centrifugó a 10000xg por 5 min a temperatura

ambiente, eliminando los precipitados. Se inyectaron 10 µl del sobrenadante en el equipo de HPLC-IR. Se utilizó la condición 19 (C19) según el análisis de robustez realizado (Tabla 3).

## **Partidores**

### **Identificación *in silico* de secuencias génicas y aminoacídicas**

Se realizó una búsqueda bibliográfica de las secuencias codificantes para *SUS* [48, 49, 50, 51, 52, 53, 49, 54], *INV* [55, 56, 57, 58, 59, 60, 54] y *HK* [61, 41, 62, 63, 64, 65, 66, 61, 63, 54]. Mediante la herramienta básica de búsqueda de alineamiento local (BLAST- del inglés The Basic Local Alignment Search Tool) se buscó secuencias aminoacídicas, homologas a las encontradas en bibliografía, en el genoma de *P. persica*, que se encuentra disponible en la base de datos Phytozome v13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), portal de genómica comparativa de plantas.

Las secuencias aminoacídicas de *SUS*, *INV* y *HK* encontradas en *P. persica*, se utilizaron para buscar, las secuencias homologas, dentro de la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para *P. avium*, especie correspondiente al portainjerto Mazzard F12/1; y dentro de la base de datos, aun no publicada, del laboratorio de Fisiología del Estrés de CEAF, para el híbrido de *P. cerasifera*  $\times$  *P. munsoniana*, correspondiente al portainjerto Mariana 2624.

### **Selección de genes y regiones a amplificar**

A partir de los resultados de RNA-seq de Arismendi y col. (2015) [17], y la identificación *in silico*, se seleccionaron, en *P. persica*, regiones CDS de transcritos de *SUS* (*Prupe.7G192300.1*, *Prupe.1G131700.1*, *Prupe.8G264300.1*), *INV* (*Prupe.2G277900.1*,

*Prupe.5G075600.2*) y *HK* (*Prupe.1G366000*), los cuales presentaron variaciones, frente a estrés por hipoxia entre los genotipos de “Mariana 2624” y “Mazzard F12/1”.

Se realizó alineamiento múltiple, de las secuencias aminoacídicas y de los transcritos de las isoformas de *SUS*, *INV* y *HK* dentro del genoma de *P. persica*, M26 y F12; utilizando el programa Jalview v 8.0.11 y el algoritmo Clustal O, seleccionando motivos no conservados.

### **Diseño y síntesis de partidores**

Las secuencias de motivos no conservados, seleccionadas, se utilizaron como hebra guía en la plataforma Primer3 versión 4,1,0 (<https://primer3.ut.ee/>). Para cada gen (anexo 4), se diseñaron dos pares de partidores con tamaño óptimo de 20 bases, temperatura de *melting* (Tm) teórica entre 55 y 62°C, contenido Guanina-Citocina (%GC) entre 45 y 55 %, y producto de amplificación entre 70-200 bases [67]. Mediante OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>), la calculadora en línea de propiedades de oligonucleótidos, se verificó *in silico*, la probabilidad de formar de horquillas, complementariedad de bases por el extremo 3' y que todos los potenciales sitios de unión entre los partidores fueran mínimos. Además, se realizó análisis de amplificación *in silico* para los pares de partidores mediante primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). Los pares de partidores se enviaron sintetizar a IDT (*Integrated DNA Technologies* - <https://www.idtdna.com/pages>).

### **Eficiencia experimental de partidores**

La especificidad de los productos amplificados se confirmó utilizando como muestra cDNA de M26 sin estresar (control positivo), mediante la presencia de un solo pico en las

curvas de *melting* (Figura 14), para esta evaluación se usó como temperatura de *annealing* 56°C o 57°C. La eficiencia de los partidores se obtuvo experimentalmente, realizando diluciones seriadas de productos de amplificación, obtenidos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se calculó el promedio entre las diferencias de los umbrales de ciclos (Ct – del inglés cycle threshold), de diluciones contiguas. Con este valor se calculó la eficiencia (Eff) y el porcentaje de eficiencia (%Eff) de la reacción de amplificación para cada par de partidores, mediante las ecuaciones 11 y 12, respectivamente.

$$[\text{EC. 11 EFICIENCIA PARTIDORES}] \quad Eff = 10^{-1/b}$$

$$[\text{EC. 12 PORCENTAJE DE EFICIENCIA}] \quad \%Eff = \frac{Eff * 100}{2}$$

Donde, b es el promedio de las diferencias de Ct. Se consideró eficiencia del 100% cuando Eff=2 y %Eff aceptable de  $100 \pm 5\%$ .

## **Análisis de expresión génica**

### **Extracción de RNA y síntesis de cDNA**

La extracción de ARN total se realizó mediante el método CTAB descrito por Chang y cols. (1993) [68], utilizando ADNasa I (Ambion, Austin, EE. UU.) para eliminar la contaminación por ADN genómico. La calidad del ARN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con RedGel. La concentración de ARN total se determinó por espectrofotometría (InfiniteR M200 Pro NanoQuant, Tecan Group Ltd., Suiza). Luego, se sintetizó ADN complementario (cDNA) a partir de 2 µg de RNA utilizando el kit de síntesis

de cDNA Maxima First Strand (Thermo Scientific, EE. UU.). El cDNA obtenido se diluyó en una relación 1:4 y, utilizando 2 µl de solución, se realizaron reacciones de *real time - qPCR*. La calidad del ARN se volvió a evaluar mediante electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con RedGel (anexo 5) [11].

### **Análisis de expresión génica mediante qPCR**

El análisis de expresión génica para *SUS*, *INV* y *HK*, seleccionados como candidatos, se realizó para 10 días de tratamiento de hipoxia y su respectivo control, mediante qPCR ejecutado en el equipo MX3000P QPCR System (Agilent Technologies, EE. UU.), usando Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, EE. UU.) como detector de fluorescencia. Los datos se normalizaron utilizando *RPII* (ARN polimerasa subunidad 2; acceso de GenBank Prupe.8G132000.1), seleccionado debido a su nivel consistente de expresión en estudios previos con *Prunus spp.* [69]. El cálculo de expresión relativa se realizó de acuerdo con el método  $\Delta\Delta C_t$  de Pfaffl (2001) [70].

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de la concentración de azúcar y expresión génica se analizaron mediante análisis de varianza de dos vías (*two ways-ANOVA*) y la prueba de comparación múltiple de Sidák, en el programa GraphPad Prism versión 8.0.2 (<https://graphpad.com/>).

## RESULTADOS

### Validación de la metodología analítica

#### Técnica analítica

Se evaluó el uso de dos columnas amino (Tabla 5), con las que se obtuvieron los cromatogramas de la figura 5 y los resultados de Rs resumidos en la Tabla 6. Dado que la columna NH<sub>2</sub>P-40 3E Shodex presenta número de plato teóricos N=2699,2 para maltosa, superior a la columna ultra amino con N=761,0 para el mismo analito, lo que se refleja en la mejora de la separación cromatográfica, principalmente entre sorbitol y glucosa.

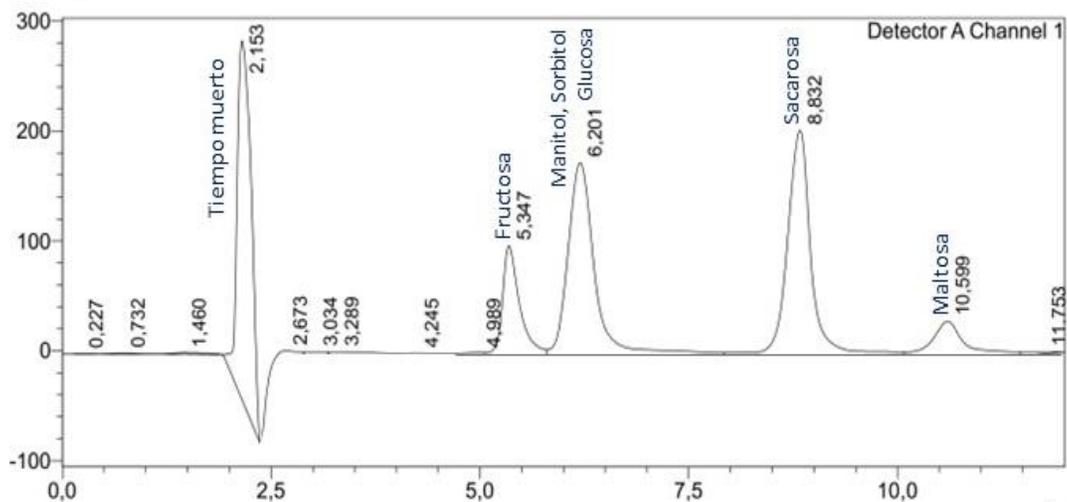
Para seleccionar los parámetros de HPLC a utilizar se evaluaron varios parámetros como la selectividad, encontrando las mejores Rs en la condición 16 con valores cercanos o mayores a 1,5 (Tabla 6) y cociente r/R de 0,72 para fructosa, 1,46 para glucosa, 0,47 para sacarosa y 1,57 para sorbitol.

**Tabla 5. Resumen de parámetros cromatográficos para identificar carbohidratos en *Prunus spp.***

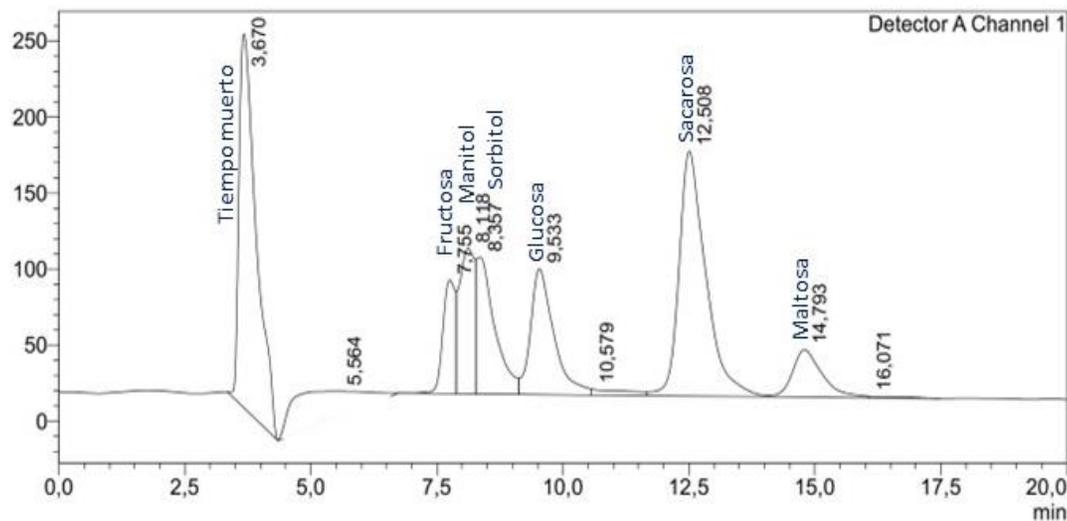
Parámetro	Condiciones											
	5			10			20					
Vol. Inyección (µl)	Sin pre-columna			Ultra amino			NH <sub>2</sub> P-50G 3A					
Pre-Columna	Ultra amino			NH <sub>2</sub> P40-3E								
Columna	70:30			75:25			80:20			83:17		
CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	0,25	0,28	0,30	0,35	0,40	0,50	0,60	1,00	1,40			
Flujo (ml/min)	30			40			45					
T° horno y detector (°C)	30			40			45					

Las características de las pre-columna utilizadas son: Ultra amino diámetro 10 mm x 4,0 mm longitud; NH<sub>2</sub>P-50G 3A diámetro de 3,0 mm x 10 mm de longitud, ambas con tamaño de partícula de 5 µm. Sin pre-columna hace referencia que la bomba y el “mixer” se conectó directamente a la columna, sin pasar por filtros antes de la columna. Las columnas tienen tamaño de partícula de 3 µm, diámetro de 4,6 mm y longitud de 15 cm, para ultra amino y de 4 µm, diámetro de 3,0 mm y longitud de 25 cm, para la NH<sub>2</sub>P-40 3E, donde ambas poseen un tamaño de poro de 100 Å.

### A) Columna ultra amino



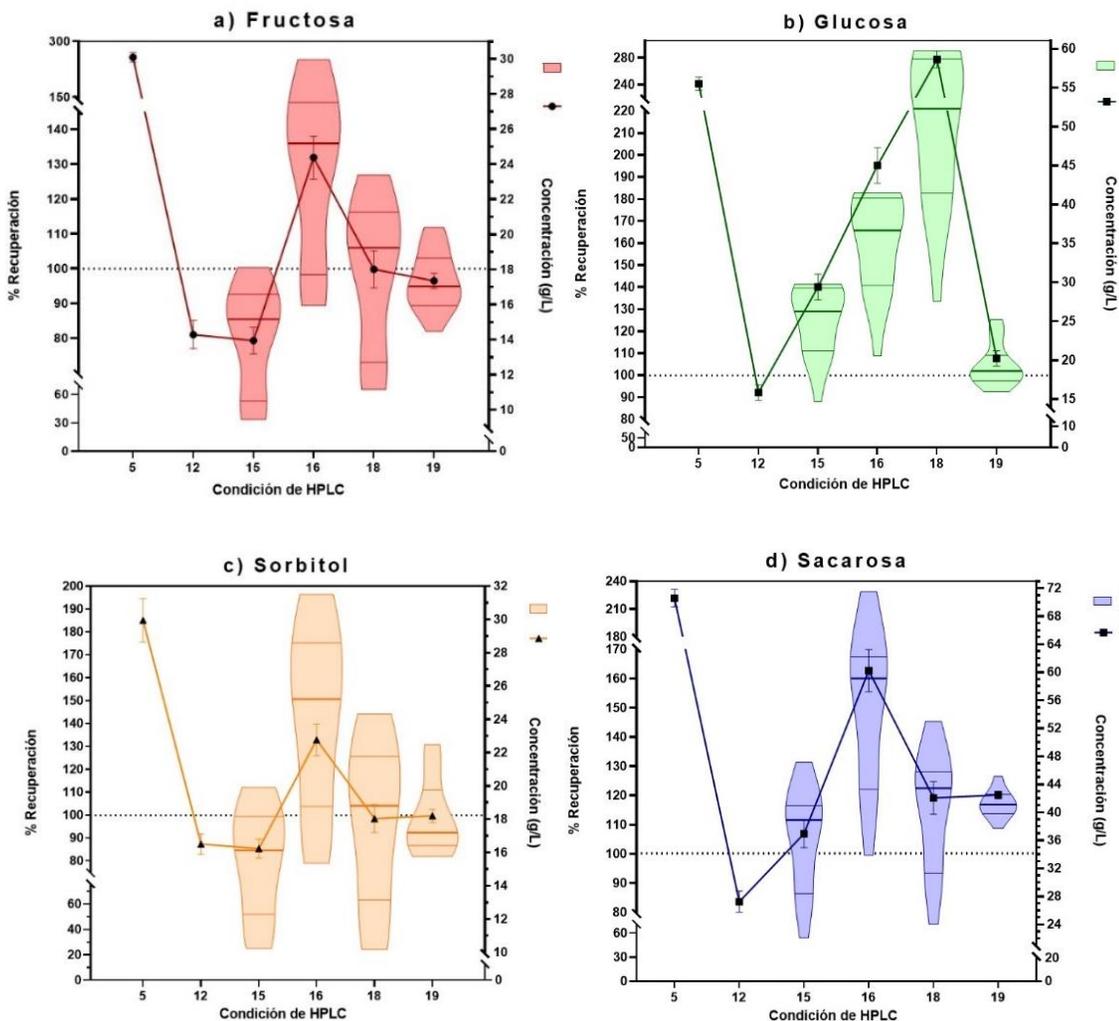
### B) Columna NH2P-40 3E



**Figura 5. Separación cromatográfica de multi estándar disueltos en acetonitrilo 50%, por columnas amino.** El multi estándar se conforma por 0,05M de fructosa, glucosa, sorbitol y sacarosa; y 0,025M de manitol y maltosa. Estos cromatogramas se obtuvieron utilizando columna ultra amino de Restek con flujo de 1 ml/min. (A) y NH2P-40 3E de Shodex con flujo de 0,4 ml/min (B), en ambos casos, con pre-columna ultra amino 10 x 4,0 mm de Restek, fase móvil de acetonitrilo 70%, 30°C en temperatura de horno y detector, con 20 µl de inyección. Los números sobre los picos cromatográficos corresponde al tiempo de retención.

**Tabla 6. Condiciones cromatográficas, curvas de calibración y parámetros de validación para 4 carbohidratos.**

	Condición 5	Condición 12	Condición 15	Condición 16	Condición 18	Condición 19
<b>Parámetros</b>						
Columna	Ultra amino Restek	NH2P-40 3E Shodex	NH2P-40 3E Shodex	NH2P-40 3E Shodex	NH2P-40 3E Shodex	NH2P-40 3E Shodex
Pre-columna	Ultra amino Restek	Ultra amino Restek	NH2P-50G 3A Shodex	NH2P-50G 3A Shodex	N/A	Igual a Cond. 16 y 18
Fase móvil	CH <sub>3</sub> CN 75%	CH <sub>3</sub> CN 80%	CH <sub>3</sub> CN 80%	CH <sub>3</sub> CN 83%	CH <sub>3</sub> CN 83%	CH <sub>3</sub> CN 83%
Flujo	1 ml/min	0.4 ml/min	0.35 ml/min	0.35 ml/min	0.25 ml/min	Igual a Cond. 16 y 18
T° horno y DIR	40°C	40°C	45°C	45°C	45°C	45°C
Vol. de inyección	15 min.	20 µl	20 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Tiempo de corrida	1.708	23 min.	18 min.	25 min.	45 min	Igual a Cond. 16 y 18
Fructosa-Sorbitol		0.809	0.614	1.163	0.862	Igual a Cond. 16 y 18
Sorbitol-Glucosa	0.000	1.023	0.890	1.554	1.194	Igual a Cond. 16 y 18
Glucosa-Sacarosa	3.508	3.202	1.712	3.066	1.969	Igual a Cond. 16 y 18
TR ± DS	5.30 ± 0.03 min.	8.2 ± 0.6 min.	10.1 ± 0.3 min.	9.5 ± 0.2 min.	12.4 ± 0.4 min.	12 ± 1 min.
Ecuación	Área=26256027[M]+106858	Área=83946977[M]+45084	Área=4970141g/L]-239745	Área=3074971g/L]-453552	Área=352621g/L]-511909	Altura= 9178*1g/L]- 283.7
R <sup>2</sup>	0.952	0.992	0.998	0.991	0.996	0.996
n	1	5	4	4	3	5
LD	0.101 M	0.012 M	-0.063 g/L	1.286 g/L	3.458 g/L	0.256 g/L
LQ	0.328 M	0.039 M	0.917 g/L	7.729 g/L	8.140 g/L	0.676 g/L
[Mix4] ± error	46 ± 2 g/L	14.6 ± 0.2 g/L	14.2 ± 0.2 g/L	23.8 ± 0.3 g/L	18.0 ± 0.2 g/L	17.39 ± 0.03 g/L
%R <sub>rec</sub>	256.844	81.069	79.184	131.846	99.777	96.527
TR ± DS	6.2 ± 0.1 min.	10.3 ± 0.6 min.	11.3 ± 0.4 min.	10.7 ± 0.2 min.	14.0 ± 0.4 min.	13 ± 2 min.
Ecuación	Área=3053782[M]-285077	Área=82925909[M]-563280	Área=2852101g/L]-117769	Área=2053251g/L]-150771	Área=1335951g/L]-389616	Altura= 5852*1g/L]+ 1963
R <sup>2</sup>	0.998	0.987	0.998	0.994	0.995	0.985
n	1	5	4	4	3	5
LD	0.015 M	0.008 M	0.002 g/L	1.663 g/L	4.953 g/L	0.381 g/L
LQ	0.074 M	0.043 M	0.970 g/L	7.256 g/L	9.704 g/L	0.804 g/L
[Mix4] ± error	43 ± 1 g/L	16.59 ± 0.08 g/L	25.2 ± 0.4 g/L	35.2 ± 0.9 g/L	50 ± 2 g/L	19.38 ± 0.08 g/L
%R <sub>rec</sub>	241.194	92.076	139.929	195.262	277.650	107.582
TR ± DS	8.9 ± 0.3 min.	15.7 ± 1.4 min.	18.9 ± 0.8 min.	19.9 ± 0.8 min.	25 ± 1 min.	24 ± 3 min
Ecuación	Área=81460720[M]-787832	Área=213432799[M]-587552	Área=4698621g/L]+ 57870	Área=3126391g/L]-146141	Área=4066961g/L]-671073	Altura= 4096*1g/L]+ 4704
R <sup>2</sup>	0.998	0.995	1.000	0.992	0.991	0.989
n	1	5	4	4	3	5
LD	0.010 M	0.007 M	0.264 g/L	2.153 g/L	4.511 g/L	0.789 g/L
LQ	0.057 M	0.029 M	0.593 g/L	8.568 g/L	11.188 g/L	2.051 g/L
[Mix4] ± error	76 ± 1 g/L	28.6 ± 0.2 g/L	36.62 ± 0.07 g/L	52.4 ± 0.5 g/L	40.8 ± 0.2 g/L	41.2 ± 0.2 g/L
%R <sub>rec</sub>	221.595	83.638	106.978	162.682	119.188	120.285
TR ± DS	6.1 ± 0.2 min	9.0 ± 0.5 min.	13.1 ± 0.4 min.	12.7 ± 0.4 min.	16.4 ± 0.6 min.	15 ± 2 min.
Ecuación	Área=44914330[M]-698322	Área=96758954[M]+835075	Área=5607111g/L]-1090595	Área=3361071g/L]-514486	Área=3832741g/L]-750121	Altura= 7264*1g/L]+ 3750
R <sup>2</sup>	0.994	0.990	0.981	0.985	0.993	0.987
n	1	5	4	4	3	4
LD	0.012 M	0.004 M	-0.164 g/L	2.422 g/L	4.474 g/L	0.795 g/L
LQ	0.077 M	0.034 M	3.993 g/L	11.644 g/L	10.349 g/L	2.010 g/L
[Mix4] ± error	33.7 ± 0.8 g/L	15.9 ± 0.1 g/L	15.5 ± 0.1 g/L	24.2 ± 0.3 g/L	17.91 ± 0.02 g/L	18.140 ± 0.004 g/L
%R <sub>rec</sub>	185.084	87.327	85.224	132.766	98.315	99.579



**Figura 6. Gráfico de cajas para mezcla de estándares 0,1M.** El eje horizontal ordena las diferentes condiciones (C) descritas en la Tabla 1, mientras que el eje vertical muestra de manera ascendente las concentraciones en molaridad. La línea horizontal segmentada indica la concentración real de la muestra, donde la exactitud es representada por el 100% de recuperación, mientras que la precisión es representada por la dispersión de los datos dentro del gráfico de violín. Las concentraciones fueron calculadas utilizando las curvas de calibración de la Tabla 1, aquellas curvas que entregan una concentración en g/L, se dividió la concentración obtenida por el peso molecular (Fructosa=180,16 g/mol, Sorbitol=182,17 g/mol, Glucosa=180,156 g/mol y Sacarosa=342,2965 g/mol). N=8.

Los LD y LQ se resumen en la Tabla 6 para cada condición y analito. Se calculó la precisión y exactitud de la técnica, que se grafica en la figura 6, utilizando un multi estándar de fructosa, glucosa, sorbitol y sacarosa de concentración 0,1M (equivalente a 18,016 g/L;

18,016 g/L; 18,217 g/L y 34,230 g/L, respectivamente). A partir de ello, se obtuvo que la condición 19 presenta menor dispersión y errores absolutos asociados a cada analito (fructosa  $\pm 0,0347$ ; glucosa  $\pm 0,0758$ ; sacarosa  $\pm 0,2029$ ; y sorbitol  $\pm 0,0042$  g/L), conllevando mayor precisión y exactitud, respectivamente.

**Tabla 7. Efecto y estadístico F calculado para los factores analizados en la robustez de la técnica.**

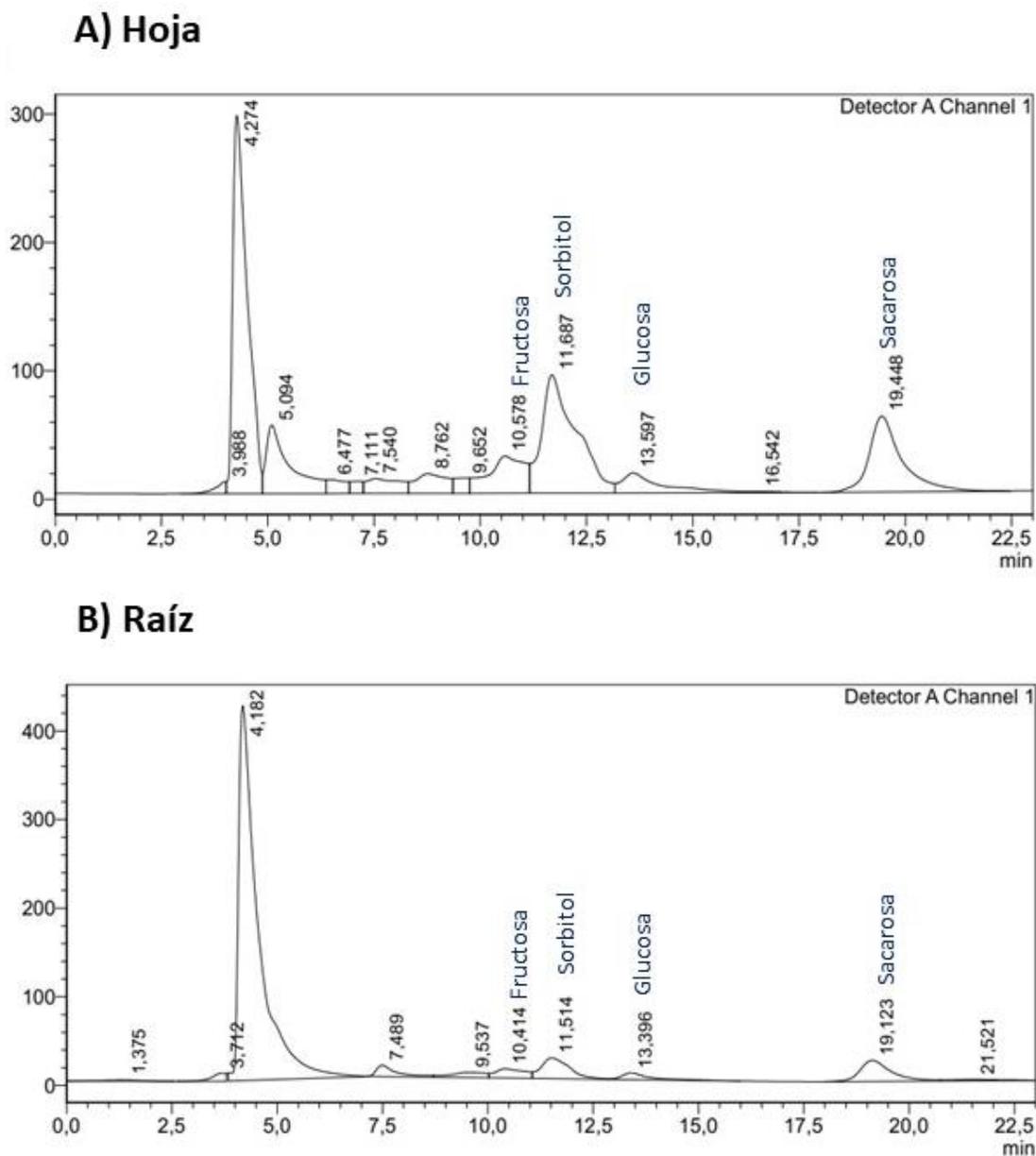
Factor	Fructosa		Glucosa		Sacarosa		Sorbitol	
	Efecto	F calculado						
A: Diámetro Pre-columna (mm) **	-0,101	0,091	0,365	0,315	0,283	0,248	0,146	0,131
Columna (tamaño partícula (µm); B: diámetro x longitud (mm)) *	0,772	0,586	1,904	0,898	1,237	0,773	1,060	0,715
C: Proporción acetonitrilo/agua (v/v)	-2,246	0,929	-2,381	0,938	-2,113	0,919	-1,809	0,886
D: Flujo (ml/min)	-7,089	0,997	-10,982	0,999	-8,389	0,998	-7,014	0,997
E: Temperatura horno y detector (°C)	3,842	0,982	5,914	0,995	4,412	0,988	3,681	0,980
F: Volumen de inyección (µl)	-1,094	0,727	-1,935	0,901	-1,341	0,801	-1,102	0,730
	F crítico	0,944	F crítico	0,977	F crítico	0,955	F crítico	0,933

\*El nivel -1 corresponde a la columna ultra amino de Restek, 0 a Puropher STAR-NH2 de Merck y +1 a NH2P-40 3E de Shodex. \*\* El nivel -1 corresponde a la pre-columna ultra amino de Restek, el nivel 0 al análisis sin pre-columna y el +1 a la pre-columna NH2P-50G 3A. En rojo se destacan los parametros influyentes en la robustez de la técnica.

Por último, la robustez analizada mediante el diseño de Plackett - Burman [44, 46], entrego como resultado que el flujo de fase móvil y la temperatura para horno y detector en conjunto, son los principales factores que afectan la robustez de la técnica analítica, de tal manera, que para los cuatro carbohidratos analizados, la respuesta analítica (%R en este caso, ver matriz Tabla 3) disminuye si aumenta el flujo y aumenta cuando se aumenta la temperatura, dado que para valores de F calculado mayores al F crítico se considera un factor influyente en la robustez de la técnica, obteniendo los resultados de la Tabla 7.

## Metodología de extracción

Para la implementación de la metodología de extracción de azúcares, se evaluó para las modificaciones de la Tabla 4, respecto a los parámetros analíticos.

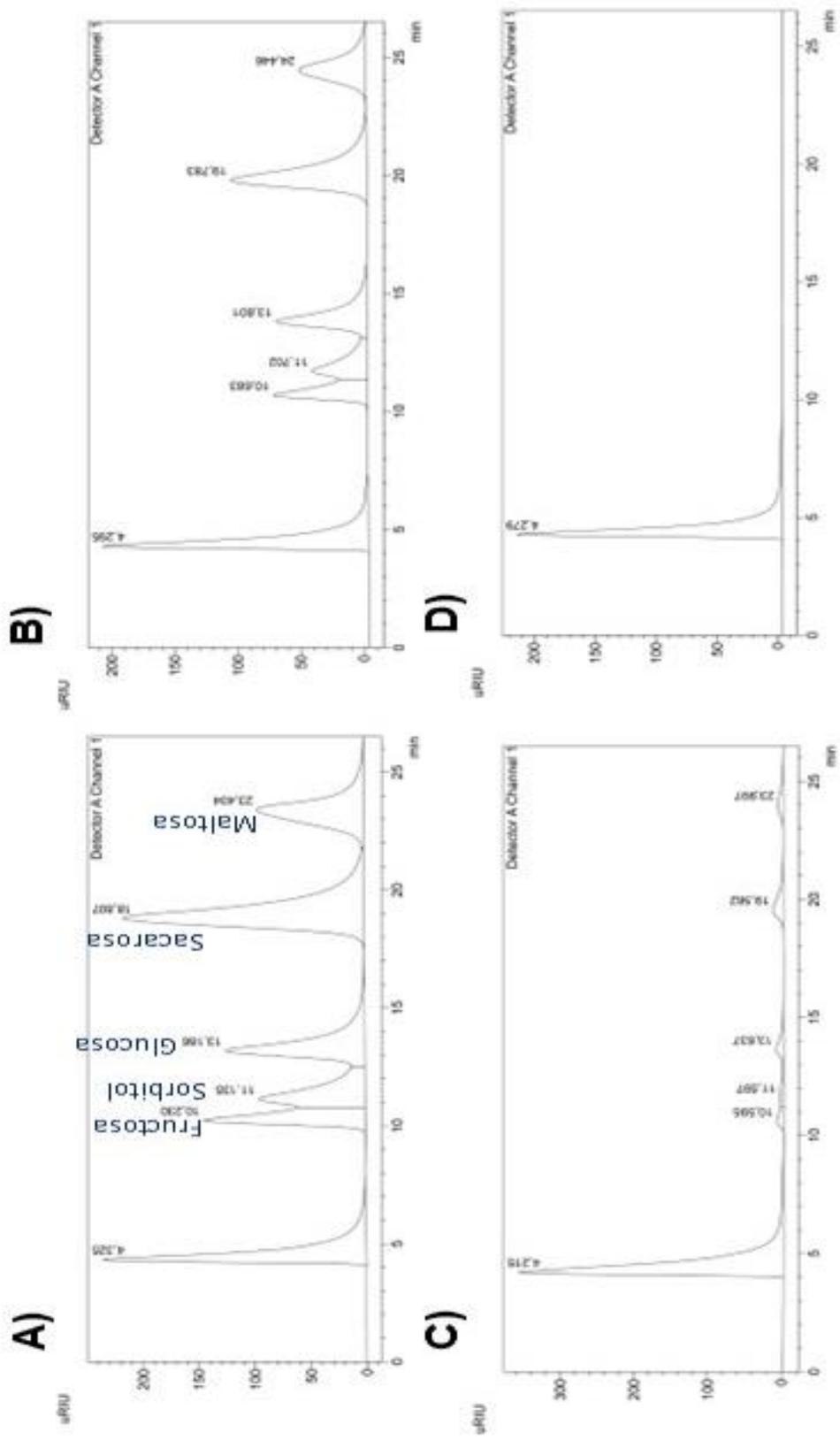


**Figura 7. Cromatogramas obtenidos a partir de muestras vegetales.** Se realizó extracción mediante metanol/agua utilizando hojas (A) y raíces (B) de la combianción homoM26 sin tratamiento estresante. Se maso 300 mg para hojas y 600 mg para raíces.

La polaridad del solvente en la extracción fue evaluada utilizando agua o soluciones alcohólicas. Seleccionando el solvente con menor tiempo de análisis, p. ej. se requerían al menos 2 días para obtener el extracto de 6 muestras, al utilizar agua, mientras que con gradientes de metanol o etanol se requiere de tan solo 1 día, sumado a mayor intensidad de los pico cromatográfico en muestras extraídas con metanol. Mientras que al comparar las extracciones en metanol y etanol, no se evidenciaron variaciones en el tiempo de análisis o características visuales durante el procedimiento de extracción (anexo 2).

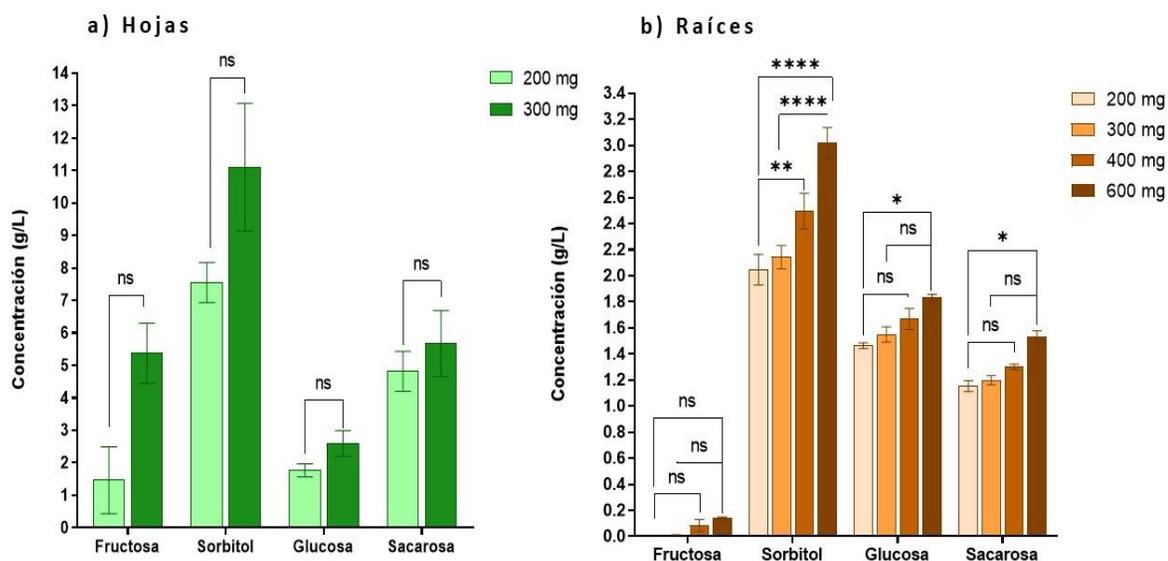
Se decidió concentrar los azúcares al vacío mediante *speed-vac* utilizando temperatura ambiental, 45°C o 65°C, las que no presentaron cambios en los picos cromatográficos de interés, pero al aumentar la temperatura, disminuye el tiempo de procesamiento. La concentración de los extractos se considera un paso relevante para cuantificar los analitos de interés, particularmente en raíces, para las cuales se realizó extracción por duplicado, juntándolas hasta obtener volumen final de 0,5 ml por muestra de raíz y hoja. Los cromatogramas se muestran en la figura 7.

Por otra parte, con el fin de eliminar impurezas e interferentes se evaluó el uso de resina, para un multi estándar de fructosa, glucosa, sorbitol y sacarosa al 0,1 M, previo a la inyección con HPLC (cromatogramas en figura 8). Este paso fue descartado dado que las condiciones usadas para la purificación mediante resina no fueron adecuadas, ya que no se logró eluir a los analitos por medio de acetonitrilo 50%.



**Figura 8. Cromatogramas inyección de multi estándar utilizando resina Bond Elut NH2.** Se ilustran los cromatogramas obtenidos para el multi estándar de 0,1 M (A), para el cual se recuperó la solución obtenida de la aplicación de la muestra (B), el lavado con agua (C) y la elución con acetonitrilo 50% (D).

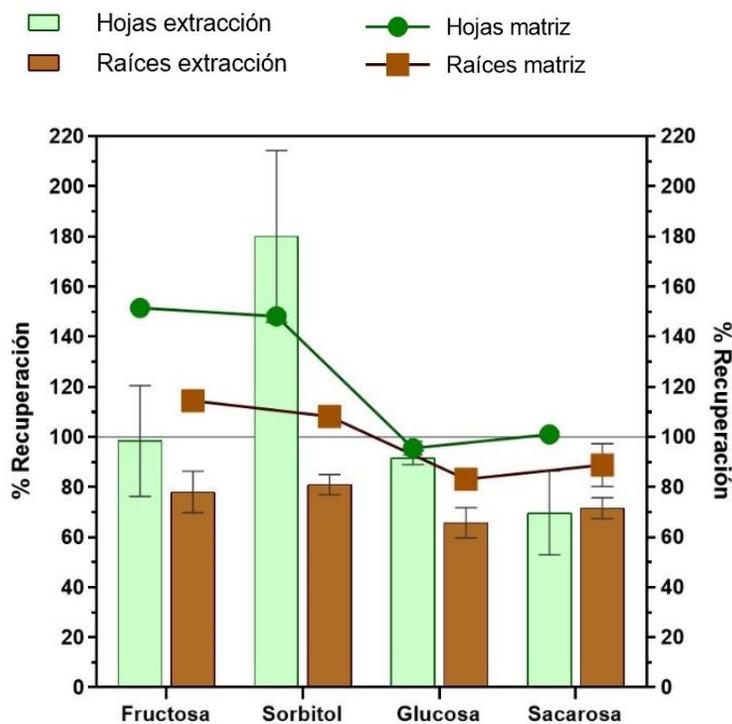
La metodología de extracción definida, que consiste en 4 lavados mediante centrifugación a 4800xg por 10 min a temperatura ambiente con {1} 0,75 ml de metanol absoluto, {2} metanol 80% y {3 y 4} con metanol 50% a 65°C, recolectando los sobrenadantes que se filtraron (0,22 µm), se concentraron en speed-vac a 65°C hasta obtener un volumen final de 250 µl y se homogenizaron con 250 µl de acetonitrilo. Solución que se centrifugó a 10000xg por 5 min a temperatura ambiente, eliminando los precipitados e inyectando 10 µl del sobrenadante en el equipo de HPLC-IR.



**Figura 9. Cantidad inicial de muestra.** Se grafica las concentraciones obtenidas para mismo genotipo vegetal en hojas (A) y raíces (B). Se comparó el promedio de las concentraciones de cada combinación entre sus controles y entre combinaciones para cada día tratamiento, mediante ANOVA de dos vías con corrección de Šidák e intervalo de confianza de 95%. Se usaron 2 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas. P value < 0,0001 = \*\*\*\*; P value < 0,001 = \*\*\*; P value < 0,01 = \*\* y P value < 0,1 = \*.

Con lo anterior, se procedió a evaluar la cantidad óptima de muestra (figura 9). Para esto se consideró las hojas como órgano productor de azúcares, por ello, se masó dos cantidades en hojas 200 y 300 mg, y cuatro en raíces, 200, 300, 400 y 600 mg. Se encontró diferencia estadísticamente significativa para sorbitol entre 300 mg, 400 mg y 600 mg en

raíces (figura 9b), por ello se decide utilizar 300 mg para hojas y 600 mg para raíces, obteniendo los cromatogramas de la figura 7. En el caso de raíces, las concentraciones encontradas estaban en el orden de 3,0 g/L, por lo que se realizó la extracción por duplicado, masando en total 1200 mg raíces por muestra, ya que si bien se podía identificar (valores sobre LD) los analitos de interés, se esperaba evitar el riesgo de no poder cuantificarlos dado que las concentraciones de los analitos se encontrarán bajo el LQ.



**Figura 10. Porcentaje de recuperación de estándares para estándares en material vegetal.** El gráfico de barras representa el porcentaje de recuperación para el estándar de 0,1M añadido previo a la extracción. El gráfico de símbolos representa el porcentaje de recuperación de 0,1M del estándar añadido después de la extracción y previo a la inyección en HPLC-IR. Para ambos casos se restó la concentración obtenida en las muestras vegetales sin fortificar. La medición se realizó por duplicado para un mismo organismo. Verde representa hojas y café las raíces. La línea gris destaca el 100% de recuperación. Se grafica el promedio  $\pm$  error estándar relativo.

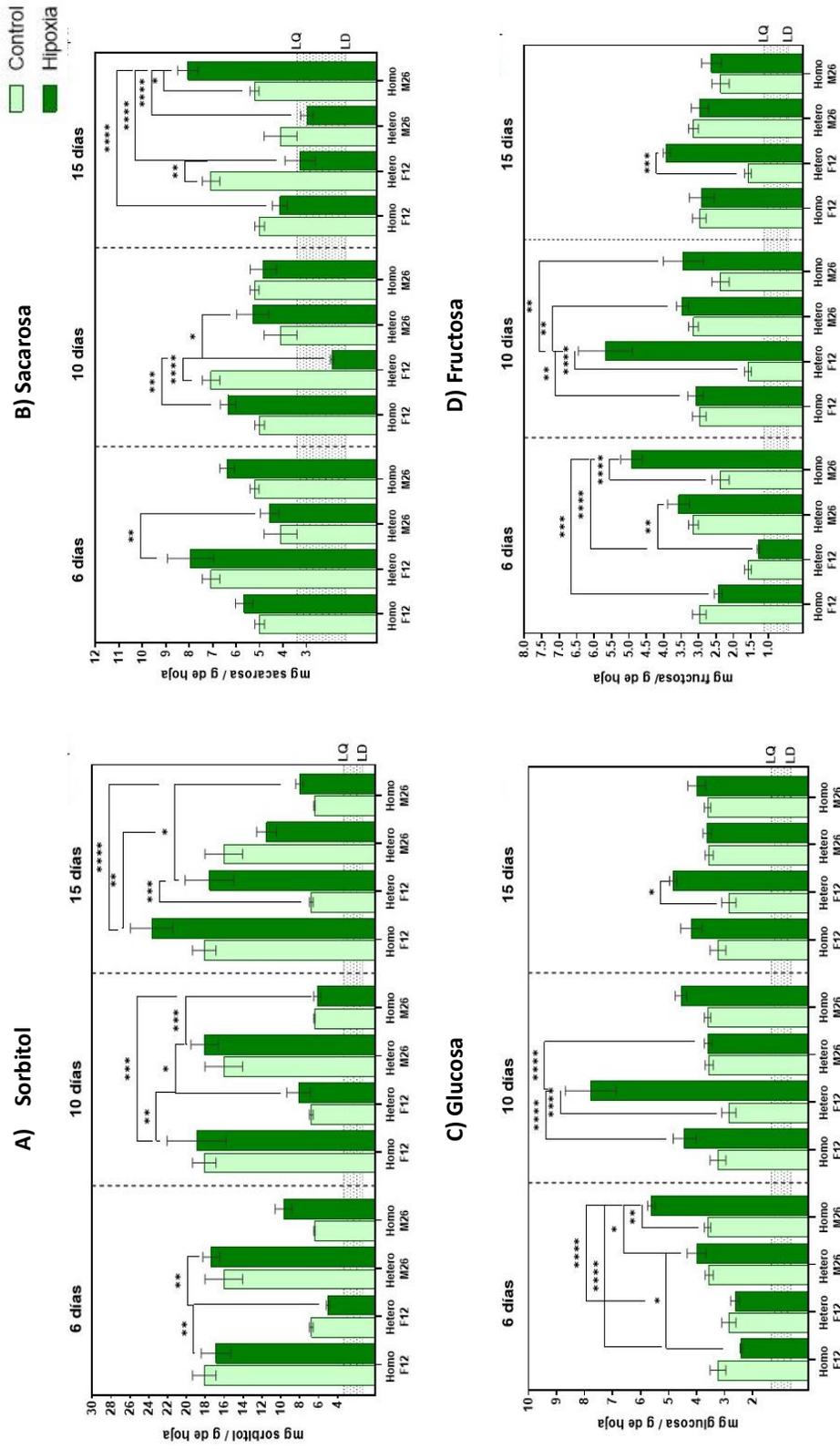
La exactitud de la metodología se evaluó mediante el %R, para cada muestra vegetal fortificada con estándar del analito, previo a la extracción, utilizando como control la muestra sin fortificar. Además, se evaluó el efecto matriz, mediante el %R del fortificado de muestras vegetales posterior a la extracción (figura 10).

Encontrando que la recuperación mediante esta metodología es entre el 80 – 100%, exceptuando para sorbitol en hojas que supera el 100%, lo que se condice con el análisis de efecto matriz, donde se identificó que la matriz de hoja produce interferencia positiva (%R>100%), principalmente para sorbitol, tanto en hojas como en raíces y en menor medida para fructosa, lo cual se podría asociar a la presencia de manitol ya que estos 2 polioles y fructosa, presentan TR cercanos (Figura 5B).

### **Concentración de carbohidratos en combinaciones de portainjertos de *Prunus spp.***

A continuación se presentan los resultados de los contenidos de azúcares obtenidos de los portainjertos descritos en la Tabla 1, extraídos mediante centrifugaciones consecutivas en 0,75 ml de metanol desde 100% - 50%, filtración y concentración al vacío (método 2.8 Tabla 4), inyectando 10 µl en HPLC-IR usando los parámetros de la condición 19, descrito en la Tabla 6.

Se encontró que en las combinaciones no estresadas, las concentraciones de azúcares en hojas varían entre 6,45 - 18,14 mg sorbitol/g hoja (Figura 11A); 4,11 - 7,07 mg sacarosa/g hoja (Figura 11B); 2,85 - 3,61 mg glucosa/g hoja (Figura 11C) y, 1,59 - 3,00 mg fructosa/g hojas (Figura 11D), mientras que en raíces se obtuvieron concentraciones sobre el LD e inferiores o cercanas al LQ, lo que permitió, en la mayoría de los casos, identificar la presencia, pero no cuantificarlos (Figura 12), por este motivo, se hablará de estos resultados en base a tendencia.



**Figura 11. Concentración de azúcares en hojas en combinaciones de portainjertos “Mariana 2624” y “Mazzard F12/1”**. Se grafican las concentraciones de sorbitol (A), sacarosa (B), glucosa (C) y fructosa (D), medidas luego de 6, 10 y 15 días de tratamiento de hipoxia. En verde claro se grafican los controles y en verde oscuro las plantas sometidas a hipoxia. Las mediciones se realizaron mediante HPLC-IR, interpolando la señal analítica en su curva de calibración y estas concentraciones se normalizaron respecto a la cantidad de muestra masada para cada muestra, para el LQ y LD también se normalizó respecto a la cantidad de muestra masada en el órgano (300 mg). Se comparó el promedio de las concentraciones de cada combinación entre sus controles y entre combinaciones para cada día de tratamiento, mediante ANOVA de dos vías con corrección de Šidák e intervalo de confianza de 95%. Se usaron 3 réplicas biológicas con 2 réplicas técnicas. P value < 0,0001 = \*\*\*\*; P value < 0,001 = \*\*\*; P value < 0,01 = \*\* y P value < 0,1 = \*.

A tiempo, 6 días, la concentración en hipoxia de Homo M26 es significativamente mayor que la de control (5,62 mg glucosa/g de hoja), esta diferencia sigue presente a los 10 días, pero con una disminución del contenido de glucosa del tratamiento con hipoxia entre 6 y 10 días. A los 15 días ya no se observan diferencias significativas entre control – hipoxia para M26. Por otra parte, la concentración de glucosa en Homo F12 aumenta al menos 2 mg/g hoja tras 10 días de tratamiento, concentración que se mantiene luego de 15 días de estrés (Figura 11C).

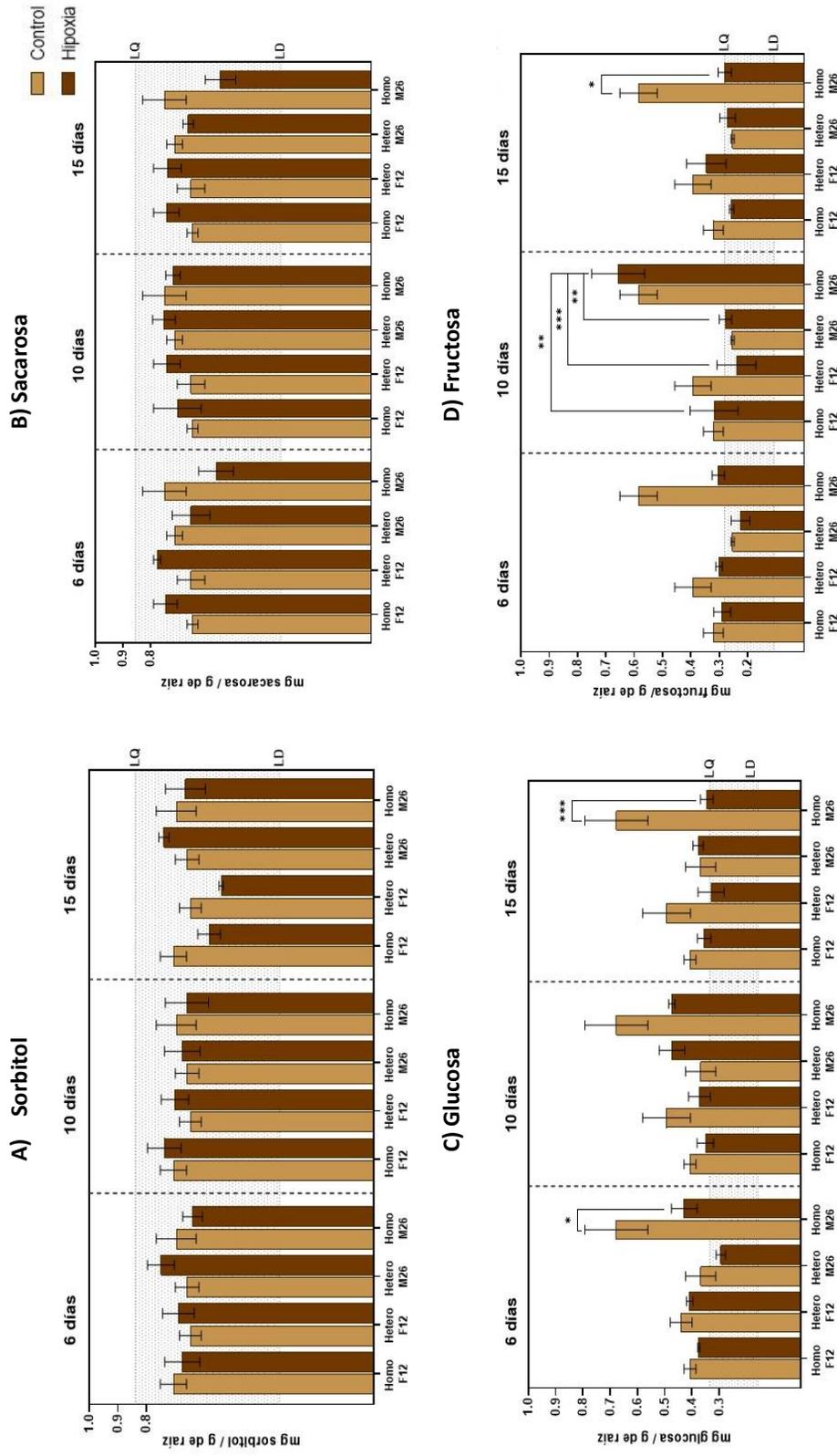
En el caso de los heteroinjertos, la combinación Hetero F12 tratada en hipoxia por 6 días no presentó cambios estadísticamente significativos respecto a su control, pero luego de 10 días, aumenta considerablemente la concentración de glucosa en hojas al menos 3 veces respecto a lo observado a 6 días, lo cual se disminuye a los 15 días de tratamiento, pero permanece 2 veces más alto que su control (Figura 11C). Al comparar esta combinación con homoinjertos no se aprecia diferencia estadísticamente significativa con hojas de Homo F12 a los 6, ni a los 15 días de deficiencia de O<sub>2</sub> radical, no obstante, a los 10 días la concentración de hojas de Hetero F12 es 3,35 mg glucosa/g hoja respecto a Homo F12 en el mismo periodo de tiempo (Figura 11C). Por último, la combinación Hetero M26 mantiene concentración constante de glucosa, fluctuando entre 3,59 y 4,00 mg/g hoja, sin presentar cambios estadísticamente significativos con su control (Figura 11C).

En el caso de glucosa en raíces (figura 12C), las concentraciones de los controles de Homo F12 y de ambos heteroinjertos se encuentran bordeando el LQ, por lo que se decidió considerar una concentración de 0,4 mg/g raíz, mientras que la combinación Homo M26 sin estrés, presenta 0,68 mg/g raíz, indicando que presenta una concentración 70% mayor que

las otras combinaciones, seguida de Hetero F12 con 25%. En condición de estrés por hipoxia las raíces del genotipo F12 no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a sus controles, ni en el transcurso del tiempo al estrés, mientras que para la combinación Hetero M26 se aprecia aumento de la concentración de glucosa en raíces al doble, a los 10 días de hipoxia, la cual disminuye luego de 15 días en hipoxia, situación similar para Homo M26, donde a los 6 y 10 días, no hay cambios estadísticamente significativos entre ellos, pero a los 15 días tiende a disminuir la concentración de glucosa en raíces anegadas.

Para fructosa en hojas (Figura 11D) de Homo F12 y Hetero M26, es decir hojas del genotipo F12, no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto a su control, pero se observa tendencia al alza entre 6 y 15 días de estrés por hipoxia, desde 2,44 a 2,9 mg fructosa/g hoja y a la baja desde 3,58 a 2,9 mg fructosa/g hoja, respectivamente. Mientras que en la combinación Hetero F12 con 10 días de tratamiento, se aprecia aumento de 4,39 mg/g hoja, respecto a 6 días y luego disminución de 1,76 mg/g hoja, a los 15 días, y en hojas de Homo M26 la concentración de fructosa disminuye desde 4,93 mg/g hoja a 2,64 mg/g hoja. Por tanto, cada combinación presenta un comportamiento específico durante los primeros 10 días de estrés, mientras que a los 15 días de tratamiento tienden a equiparse con su control.

Por otro lado, la concentración de fructosa en raíces (Figura 12D) no se pudo medir la concentración al encontrarse bajo el LQ, pero se observó que se comporta similar a la concentración de glucosa en raíces, ya sea en las diferentes combinaciones o al encontrarse sometidas al estrés por más tiempo.



**Figura 12. Concentración de azúcares en raíces en combinaciones de portulacastrum “ Mariana 2624” y “ Mazzard F12/1” .** Se grafican las concentraciones de sorbitol (A), sacarosa (B), glucosa (C) y fructosa (D), medidas luego de 6, 10 y 15 días de tratamiento de hipoxia. En vcafé claro se grafican los controles y en café oscuro las plantas sometidas a hipoxia. Las mediciones se realizaron mediante HPLC-IR, interpolando la señal analítica en su curva de calibración y estas concentraciones se normalizaron respecto a la cantidad de muestra masada para cada muestra, para el LQ y LD también se normalizó respecto a la cantidad de muestra masada en el órgano (1200 mg). Se comparó el promedio de las concentraciones de cada combinación entre sus controles y entre combinaciones para cada día de tratamiento, mediante ANOVA de dos vías con corrección de Šidák e intervalo de confianza de 95%. Se usaron 3 réplicas biológicas con 2 réplicas técnicas. P value < 0,0001 = \*\*\*\*; P value < 0,001 = \*\*\*; P value < 0,01 = \*\* y P value < 0,1 = \*.

Para sacarosa en hojas (Figura 11B) a 6 días de tratamiento con hipoxia, no se observan diferencias estadísticamente significativas, entre las plantas tratadas con hipoxia y sus respectivos controles, en las cuatro combinaciones. Mientras que al comparar las concentraciones de sacarosa, en hojas de plantas estresadas por hipoxia, durante más tiempo, se aprecia distanciamiento respecto a sus respectivos controles, destacando Hetero F12, combinación que a los 10 días disminuye desde 7,95 mg sacarosa/g hoja hasta valores bajo el LQ y volviendo a aumentar a 3,28 mg sacarosa/g hoja a 15 días de hipoxia y el caso de la combinación Homo M26 la cual disminuye en 2 mg/g hoja entre los 6 y 10 días de hipoxia, para luego aumentar 4 mg/g hoja a los 15 días, respecto a 10 días de tratamiento, diferenciándose de su control en aproximadamente 3 mg sacarosa/g hoja.

Respecto a sacarosa en raíces (Figura 12B) se identificó la presencia de este analito, sin cuantificarlo debido a que las concentraciones obtenidas eran inferiores al LQ. El mismo efecto se aprecia en las concentraciones de sorbitol en raíces (Figura 12A).

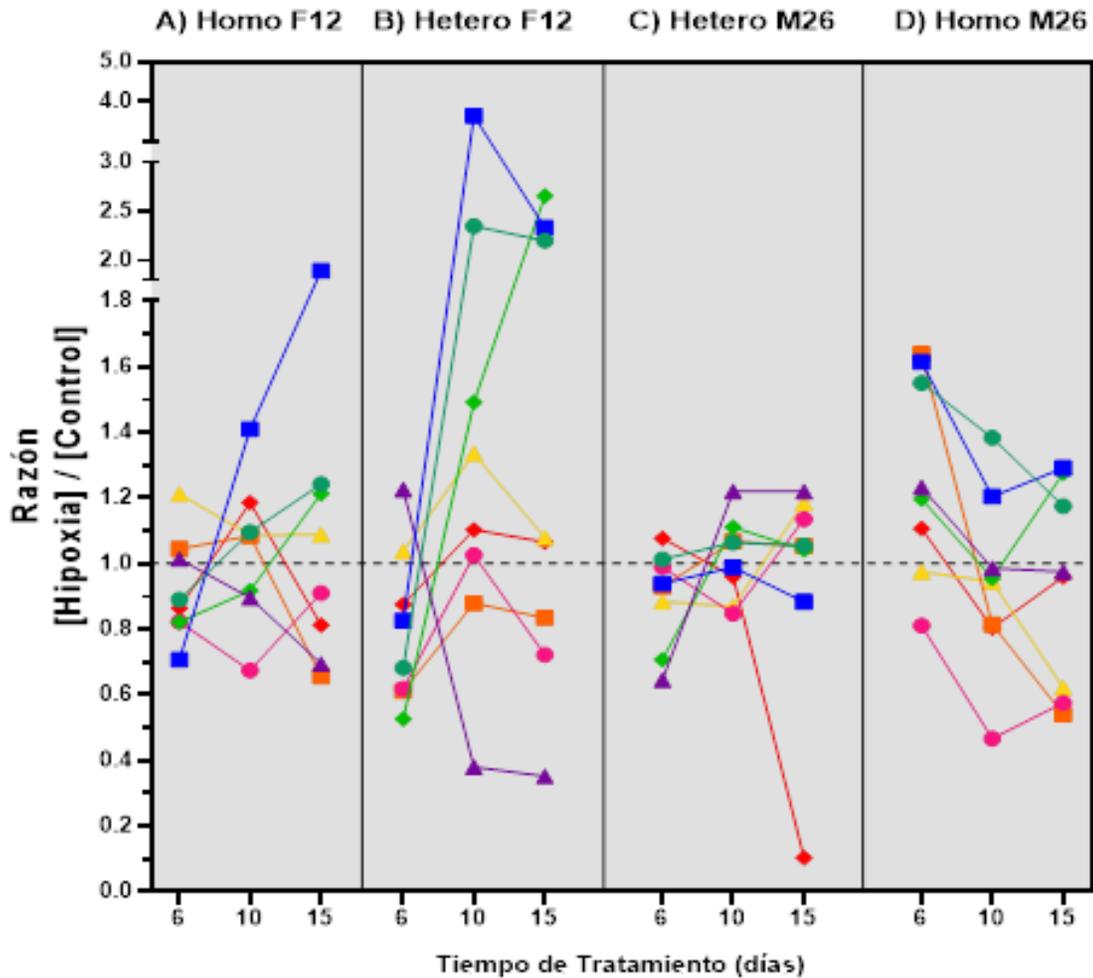
En las concentraciones de sorbitol en hojas (Figura 11A), se observó que a los 6 días de tratamiento las hojas del genotipo F12, es decir, combinaciones Homo F12 y Hetero M26, presentan las mayores concentraciones, con valores promedios cercanos a 17 mg sorbitol/g de hoja, sin diferencias estadística respecto a sus controles, tendencia que se mantiene a los 10 días de tratamiento. Mientras que a 15 días de estrés la concentración de sorbitol de Hetero F12 aumenta alcanzando al control de Homo F12, contrario a la disminución de la diferencia entre Homo M26 y Hetero M26, la que disminuye en 4,21 mg sorbitol/g hoja.

Teniendo presente la heterogeneidad anatómica de las muestras, se graficó el cociente entre las concentraciones promedio del analito, presente en muestras tratadas en hipoxia y su

control, respecto al tiempo que se sometieron al tratamiento por hipoxia (Figura 13), con el fin de normalizar los resultados obtenidos.

Así, para hojas se aprecia un aumento brusco de las concentraciones de fructosa al utilizar portainjerto sensible (F12) entre 6 y 15 días de estrés por hipoxia, mientras que en raíces el mismo azúcar decae 0,43 veces entre 10 y 15 días de tratamiento en el homoinjerto y 0,04 veces el heteroinjerto en el mismo periodo. En el caso de glucosa también aumenta la relación en hojas de estas combinaciones, donde en el homoinjerto, el aumento es del 20%, mientras que en Hetero F12 es del 100%. En el caso de las raíces se observa un comportamiento opuesto, donde Homo F12 presenta una concentración mínima a los 10 días de hipoxia y Hetero F12 máxima, igualando la concentración del control (Figura 13).

En el caso de la sacarosa, el Homo F12 presenta tendencia a la baja tanto en hojas como en raíces, mientras que en Hetero F12 se observa una disminución considerable (cerca al 90%) en hojas de entre 6 y 10 días de tratamiento, en raíces aumenta un 30% la concentración a los 10 días respecto a 6 días, la cual, a los 15 días, decae al valor de los 6 días. Finalmente, el sorbitol presenta una tendencia, en aumento, similar a glucosa y fructosa en hojas Hetero F12, mientras que en sus raíces a los 10 días aumenta la concentración, superando en 10% al control y manteniéndose en este valor a los 15 días, lo cual no se observa en Homo F12, sorbitol presenta un alza considerablemente menor en hojas lo que se relaciona con la respuesta en raíces.



**Figura 13. Razón entre concentraciones obtenidas en hipoxia y controles.** Se grafica el promedio del cociente entre la concentración en tratamiento de hipoxia por anegamiento y sus respectivos controles bien regados para combinaciones de portainjertos, injertados sobre si, donde valores  $> 1$  indica aumento de la concentración respecto al control, valores  $< 1$  disminución de la concentración respecto al control y valores  $= 1$  indican que no hay cambio respecto al control. Se agruparon los resultados en combinaciones de Homo F12 (A), Hetero F12 (B), Hetero M26 (C) y Homo M26 (D), y la variable independiente, corresponde a los días de tratamiento de hipoxia. No se realizó análisis de varianza, por tanto se considera como un gráfico de tendencia. Se usaron 3 réplicas biológicas con 2 réplicas técnicas.

#### Simbología

Hojas	
●	Glucosa
■	Fructosa
▲	Sacarosa
◆	Sorbitol

Raíces	
●	Glucosa
■	Fructosa
▲	Sacarosa
◆	Sorbitol

Esta información podría estar indicando que tanto el portainjerto como el vástago detectan el estrés, generando una respuesta en conjunto, por lo que es probable que en el caso

Hetero F12, las hojas del vástago (genotipo M26) a los 10 días de hipoxia, son capaces de aumentar la producción de azúcares, o bien, extraerlas desde órganos de almacenamiento, y degradar sacarosa a sus monómeros, así como transportar sacarosa y sorbitol hacia las raíces (genotipo F12) donde son utilizados para sobrevivir.

Por otra parte, en hojas de plantas injertadas sobre M26 la concentración de los azúcares, no se diferencia en gran magnitud respecto a sus controles como es el caso de las plantas injertadas sobre F12, con esto, vale decir, que en el caso de Hetero M26, el cual posee hojas de genotipo F12, tanto glucosa como fructosa se mantienen distante de su control dentro del 10%, al alza en el caso de fructosa y a la baja en glucosa, mientras que sacarosa y sorbitol a los 6 días presentaba 0,3 veces menos concentración en hipoxia que su control, mientras que a los 10 días de tratamiento estas concentraciones aumentan por sobre el control. En cuanto, a Homo M26 el patrón de comportamiento entre 6 y 10 días es similar para los cuatro azúcares estudiados, disminuyendo la concentración en hipoxia hasta igualarse con el control en el caso de sorbitol y sacarosa, mientras que glucosa y fructosa disminuyen la concentración en hipoxia un 20 y 40%, respectivamente.

### **Identificación y diseño de partidores para SUS, INV y HK**

Con el fin de dilucidar el metabolismo que se asocia directamente a las concentraciones de azúcares obtenidas en raíces y hojas de las combinaciones de portainjertos en hipoxia, se realiza un análisis de expresión génica, para lo que se necesitaba identificar los genes, en los genomas de M26 y F12, y diseñar partidores específicos para los genes de principal interés.

**Tabla 8. Secuencias de partidores utilizados.**

Enzima	Gen	Gen homólogo <i>P. persica</i>	Secuencia partidor 5'->3'	Largo (nt)	%GC	T°m (°C)
Hexokinasa	HK3	PRUPE.1G366000	F- AAACCCTCAGCTTTGTACCCAA	22	45.5	56.8
			R- TGGTTTTGGGTAGCTGACATGA	22	45.5	56.5
Sacarosa Sintasa	SUS1	PRUPE.7G192300.1	F- CTAGAAGTGGCCAAAAGTCCG	21	52.4	55.8
			R- AAGTGCAGAGAAAGAGGGGC	20	55.0	57.4
	SUS2	PRUPE.1G131700.1	F- CCCTGCTGAGATCATTGAGC	20	55.0	55.7
			R- GCACTGGTCAAAGAAGTCAACC	22	50.0	56.4
	SUS3	PRUPE.8G264300.1	F- GATGAGTGATGCGTGGTATGA	22	45.5	57.2
			R- CATAACACACAACAACAAGCG	22	50.0	55.0
Invertasas	INVv2	PRUPE.2G277900.1	F- ACAACCACCAATCTCCATGCTT	22	45.5	57.1
			R- GCAAGTGGGGTTTGAGAGAGAA	22	50.0	57.2

F: forward, R: reverse.

Las secuencias peptídicas de SUS, INV y HK, encontradas en los genomas de los portainjertos F12 y M26 (anexo 3), permitió comparar con secuencias de SUS, INV y HK, descritas previamente para arroz (*Oryza sativa*), álamo negro (*Populus trichocarpa*) y manzano (*Malus domestica*). Se encontraron, *in silico*, 4 posibles SUS, 3 posibles INV (1 alcalina neutra y 2 ácidas) y 4 posible HK para M26, mientras que para F12 se encontraron 8 posibles SUS, 23 posibles INV (15 alcalinas neutras y 8 ácidas) y 4 posibles HK.

Las proteínas de SUS encontradas en M26 tienen un largo entre 806 y 897 aminoácidos (aá), con un peso molecular promedio de 95,48 KDa, y para F12 entre 750 y 903 aá, con un peso molecular promedio de 94,06 KDa. En el caso de las proteínas predichas de INV en F12 tienen un largo entre 551 y 685 aá, peso molecular promedio de 68,99 KDa, y en M26 presentan largo entre 418 y 686 aá, con peso molecular promedio de 67,45 KDa (características en anexo 4).

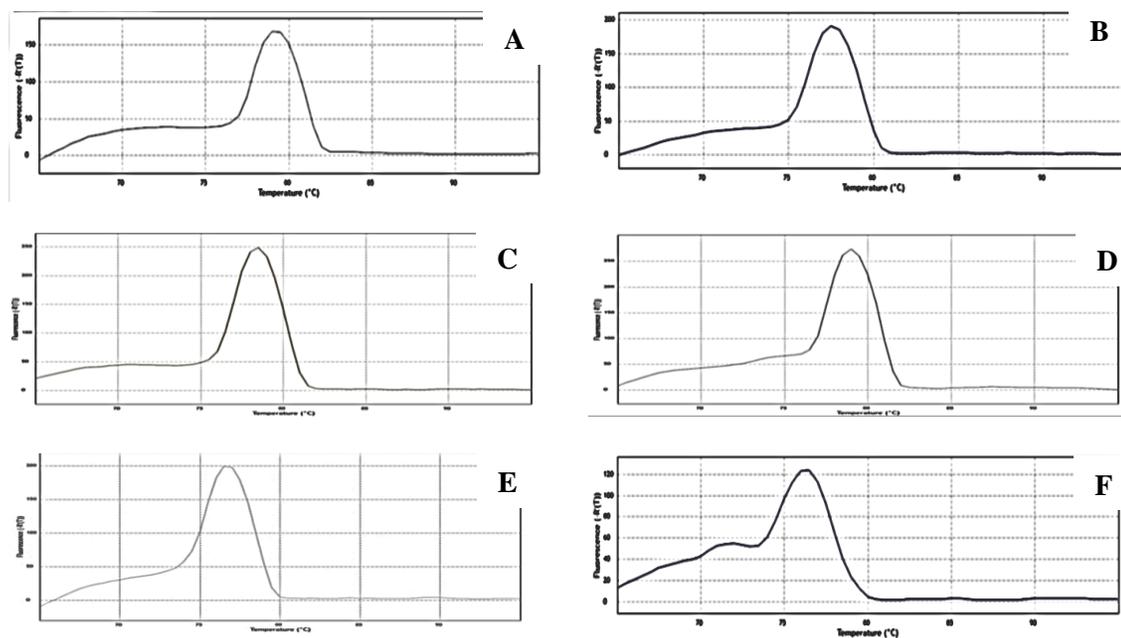
Una vez identificadas las secuencias pépticas, se consideró los transcritos, homólogos en *P. persica* de HK3, SUS1, SUS2, SUS3 e INVv2, para el diseño de partidores, en regiones no conservadas. De todos los partidores diseñados (anexo 5), se seleccionaron para esta tesis

los que se resumen en la Tabla 8, a los que se les calculó la eficiencia experimental (Tabla 9) y analizó las curvas de *melting* (Figura 14).

**Tabla 9. Características PCR para cada para de partidores utilizados.**

Gen	Gen homólogo <i>P. persica</i>	T <sup>a</sup> (°C)	Pendiente (b)	R <sup>2</sup>	Eficiencia	% Eficiencia
HK3	PRUPE.1G366000	56.0	-3.35	0.980	1.988	99.4
SUS1	PRUPE.7G192300.1	56.0	-3.44	0.985	1.952	97.6
SUS2	PRUPE.1G131700.1	56.0	-3.28	0.991	2.018	100.9
SUS3	PRUPE.8G264300.1	56.0	-3.47	0.985	1.943	97.1
INVv2	PRUPE.2G277900.1	57.0	-3.43	0.995	1.957	97.8

Se aceptó un porcentaje de Eficiencia entre 95 y 105%. La temperatura de *annealing* (T<sup>a</sup>) se selecciono según la presencia de un solo pick en la curva de *melting*, la pendiente (b) fue calculada mediante el promedio de la diferencia de los Ct contiguos para diluciones del amplicón, multiplicado por (-1). El coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>) fue calculado mediante la construcción de una recta entre el factor de dilución y el Ct obtenido.



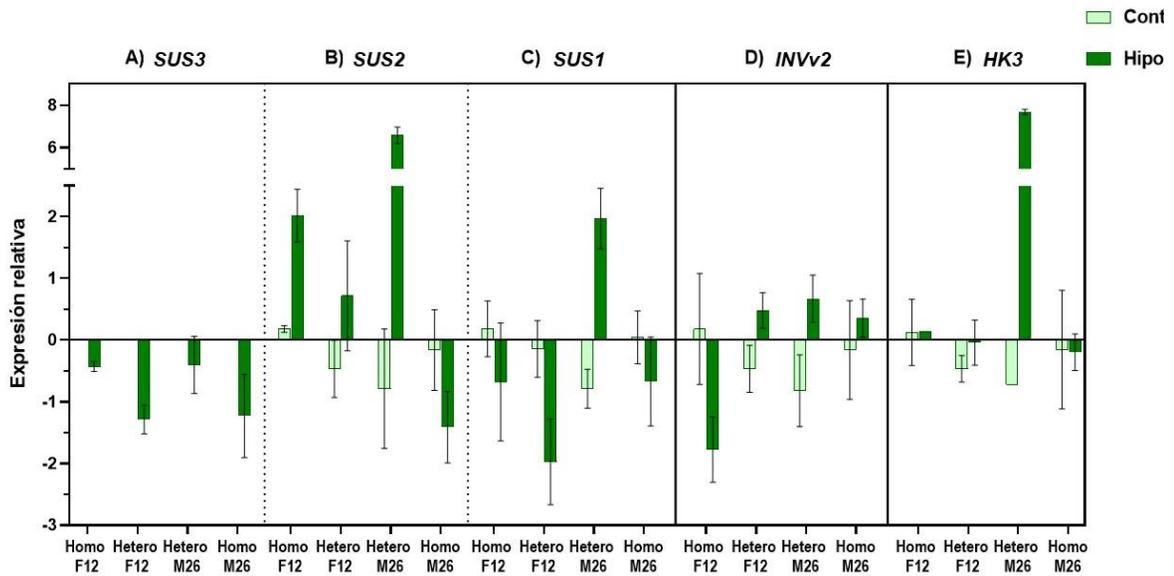
**Figura 14. Curva de *melting* para partidores usados en este trabajo. A) HK3; B) INVv2; C) SUS1 D) SUS2 E) SUS3 F) RPII (gen reredencia) para muestras de hojas.**

En cuanto, a los resultados de eficiencia, al redondearlos a la unidad, cada par de partidores presentaría eficiencia de 2, lo que equivale a una eficiencia del 100%, como indica Livak & Schmittgen (2001) [71]. Además, las curvas de *melting* presentan un solo pick, lo que indica la presencia de un solo producto de amplificación con las temperaturas de *annealing* usadas, exceptuando para el gen de referencia que muestra un pick previo, el cual se debería a dímeros de partidador, que se puede solucionar evaluando otra temperatura de *annealing*.

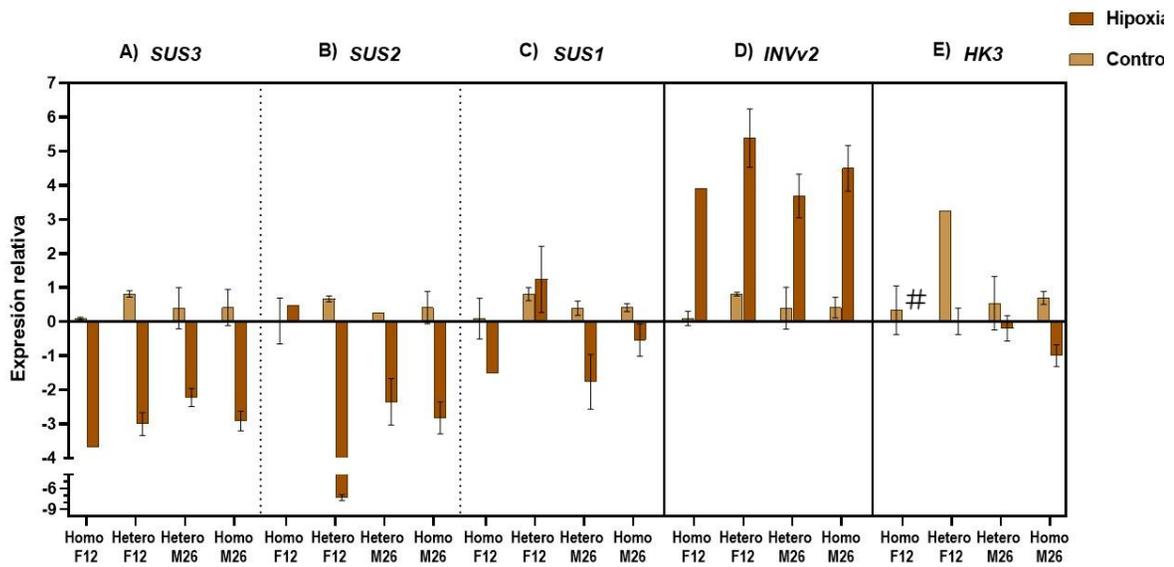
### **Expresión génica de SUS, INV y HK en combinaciones de portainjertos de *Prunus spp.***

Los resultados de expresión génica se obtuvieron con los partidores descritos en la Tabla 8, para 3 *sacarosas sintasas* (*SUS1*, *SUS2* y *SUS3*), 1 *invertasa* (*INVv2*) y 1 *hexoquinasa* (*HK3*), los cuales habían reportado variaciones en análisis transcripcional previos, para portainjertos F12 y M26, sometidos a hipoxia radical [41, 17].

La expresión génica de *SUS*, se observó, tanto en hojas, como en raíces, de todas las combinaciones sometidas a hipoxia, donde la represión del gen *SUS3*, es mayor en hojas M26 (Figura 15A). Por otro lado, en hojas se aprecia una considerable sobreexpresión de *SUS2* en Hetero M26 y Homo F12, 8 veces y 2 veces sobre el control respectivamente, y en menor magnitud en Hetero F12, sobre expresándose 1 vez sobre el control (Figura 15B). Caso opuesto ocurre en raíces, donde en Hetero F12, Hetero M26 y Homo M26 que reprime *SUS2* fuertemente en magnitudes de 9, 2 y 3 veces bajo el control, respectivamente, mientras que en Homo F12 se sobreexpresó *SUS2*, cerca de 0,5 veces respecto al control (Figura 16B).



**Figura 15. Expresión génica relativa en hojas de combinaciones de portainjertos sometidos por 10 días de tratamiento por hipoxia.** Se analizó la expresión *SUS3* (A), *SUS2* (B), *SUS1* (C), *INVv2* (D) y *HK3* (E) respecto al gen de referencia (*RPII*), donde valores negativos indican represión y valores positivos sobreexpresión. Se usó al menos 2 réplicas biológicas con 1 réplica técnica.



**Figura 16. Expresión génica relativa en raíces de combinaciones de portainjertos sometidos por 10 días de tratamiento por hipoxia.** Se analizó la expresión *SUS3* (A), *SUS2* (B), *SUS1* (C), *INVv2* (D) y *HK3* (E) respecto al gen de referencia (*RPII*), donde valores negativos indican represión y valores positivos sobreexpresión. Se usó al menos 2 réplicas biológicas con 1 réplica técnica. # no hay amplificación para *HK3* en raíces de HomoF12 sometido a hipoxia.

En el caso de *SUS1*, se aprecia represión del gen en homoinjertos del 0,5 veces bajo su control y, predominantemente se reprime, en hojas de Hetero F12 (12 veces por debajo del control), y sobreexpresión en Hetero M26 (3 veces sobre el control). En raíces de heteroinjertos, tiende a la sobreexpresión de *SUS1* en Hetero F12 (similar a control) y represión en Hetero M26 (2 veces bajo el control), mientras que en homoinjertos se reprime el gen *SUS1* en raíces estresadas al menos 1,5 veces en Homo F12 y 1 vez en Homo M26 (Figura 16C).

Por otra parte, la *INVv2*, se reprime al menos 2 veces en hojas de Homo F12 en hipoxia, mientras que en las otras combinaciones se sobreexpresó entre 1 y 1,5 veces respecto al control, los cuales se ven reprimidos en relación con el gen de referencia. En el caso de Homo M26, si bien, no hay cambio estadísticamente significativo, la tendencia respecto al gen de referencia, muestra represión en control y sobreexpresión en hipoxia, para Homo M26. Por otro lado, el gen *INVv2*, en raíces de las combinaciones sometidas a hipoxia, se sobre expresó en todas ellas al menos 4 veces, respecto al gen de referencia y a su control (Figura 16D).

Finalmente, en el caso de la *HK3*, en hojas de las combinaciones de homoinjertos y Hetero F12 sometidas a hipoxia, no hubo cambios significativos, respecto a *RPII* ni a su control, sin embargo, Hetero M26 sobreexpresó *HK3*, 8 veces sobre el gen de referencia y 9 veces sobre su control. Por otro lado, debido a la ausencia de amplificación para combinación Homo F12 en raíces sometidas a hipoxia, se infiere que no hay expresión del gen en esta condición (Figura 16E).

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En primera instancia se requería implementar y validar una metodología analítica para la cuantificación de carbohidratos por HPLC-IR [72]. Para ello se verifica, a través de evidencia objetiva que el método se desempeñe acorde a los requisitos analíticos definidos, como son las cifras de mérito [73, 72, 74].

Considerando los analitos: glucosa, fructosa, sacarosa y sorbitol en muestras complejas, como lo es el material vegetal utilizado se decidió utilizar el sistema HPLC-IR, el cual mide la diferencia de índice de refracción, de los componentes del efluente [44]. Este detector limita la utilización de gradiente de fase móvil, ya que es muy sensible al cambio de proporción en la fase móvil, lo que permitió separar de mejor forma los compuestos de estructuras similares, siempre que se trabajara en modo isocrático. y con temperatura de horno igual a la del detector, la que debe ser superior a la del medio ambiente, para evitar interferencia por la temperatura ambiental [47, 44]. Esto se refleja en la robustez de la técnica, donde la medición es sobrestimada al aumentar la temperatura entre mediciones.

Por otro lado, se requería una metodología breve y eficiente. La elección del solvente jugó un rol predominante ya que el gradiente de metanol utilizado permitiría en una primera instancia romper estructuras celulares, como pared celular y membranas, dado que el metanol actúa como surfactante, conllevando al aumento en la fluidez de la membrana celular hasta su ruptura y el agua permitiría disolver los compuestos polares, incluyendo los analitos [75].

Además, las muestras extraídas en metanol/agua se pudieron almacenar a 4°C (temperatura de *autosampler*), por al menos 21 días sin cambios evidentes (anexo 2), a

diferencia de las extraídas en agua, las que no superaban los 5 días en estado óptimo para análisis. Sumado a lo anterior, se aconseja almacenar contramuestra en viales a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Los resultados de selectividad, propiedad del método de producir una señal medible debida solo a la presencia del analito, libre de la interferencia de otros componentes que se encuentren en la matriz de la muestra [72, 44], se determinó mediante la  $R_s$  (figura 5 y Tabla 6), lo que permitió seleccionar entre dos columnas cromatográficas de fase normal, con fase estacionaria de grupos  $\text{NH}_2$ . La mejor  $R_s$  se obtuvo con la condición de HPLC 16 para los 4 analitos (Tabla 6), pero se continuó trabajando con la condición 19 para evitar alzas de presión que pudieran dañar el equipo. Se recomienda para futuros análisis, utilizando la condición 16, añadir un filtro previo a la pre-columna, el cual deberá ser reemplazado periódicamente, incorporar sesiones de lavados de la columna según las instrucciones del proveedor o realizando cambios de polaridad de la fase móvil, estas sugerencias no se evaluaron en este trabajo. Al usar la columna  $\text{NH}_2\text{P-40 3E}$ , se recomienda flujo entre 0,25 y 0,30 ml/min, pre-columna  $\text{NH}_2\text{P-50G 3A}$  y temperatura de horno de  $40^{\circ}\text{C}$ .

Otros parámetros de desempeño evaluados son intervalo de trabajo, LD y LQ [72], los cuales se obtuvieron a partir de curvas de calibración de cada analito, identificando la región de la curva donde presentan un comportamiento lineal y que, por tanto, se ajusta a la ecuación de la recta descrita, esto también permitió determinar los valores mínimos de trabajo (anexo 2).

Al comparar con literatura, se ha encontrado, que usando HPLC-IR, para cuantificar en total nueve azúcares y polioles, en una fórmula básica de crema para postre, el LD está en el rango de 0,01 – 0,17 g/L y el LQ entre 0,03 – 0,56 g/L [81]. En donde, los analitos

estudiados en concentraciones inferiores al LD, no se pueden identificar con certeza, dado que la señal se puede confundir con ruido y en este trabajo el LD está entre 0,3 - 0,8 g/L y el LQ entre 0,6 y 2,0 g/L dependiendo del analito, rangos que se encuentran por sobre los descritos en la literatura, en una matriz sintética, a diferencia del tipo de matriz de las hojas y raíces de *Prunus spp.*

Como se ha mencionado, los contenidos de los cuatro analitos en raíces, en este trabajo se aproximan al LQ, lo que equivale al rango entre 3,3 y 10 mg/g raíz (peso fresco). En un estudio de sequía, en portainjertos de *Prunus spp.*, se encontraron concentraciones de sacarosa son de 16 - 37 mg/g raíz (peso seco), glucosa: 9 - 28 mg/g raíz (peso seco) y sorbitol: 8 - 19 mg/g raíz (peso seco), en raíces [76], es decir que, presentaron al menos 10 veces más contenido de azúcares que al ser sometidos a hipoxia. Estos estudios se diferencian, además de la condición del estrés, en que, para esta tesis, no se corrigió la masa por el factor de humedad, lo que influiría en la concentración presente en la muestra, pudiéndose diluir en el órgano.

La precisión y exactitud de la técnica se relaciona, en parte, con el detector. La precisión fue analizada mediante la desviación estándar de las concentraciones obtenidas dentro de un mismo día (repetibilidad-r) y en diferentes días (reproducibilidad-R) [72], con los que se obtuvo el cociente r/R para fructosa (0,72), glucosa (1,46), sacarosa (0,47) y sorbitol (1,57), indicando que esta técnica, en las condiciones que se realizaron los análisis tiene baja repetibilidad considerando que los valores son  $\leq 1,5$ , pero cuando se considera que los análisis fueron realizados en matrices complejas, como lo es un material vegetal, estos valores se consideran muy buenos, incluso son comparable con los cocientes r/R de

Hadjikinova y col. (2017), grupo que trabajo en análisis de azúcares y polioles mediante HPLC-IR, utilizando una columna de exclusión molecular por tamaño e intercambio de ligando (cociente r/R para glucosa: 1,024; fructosa: 1,029; sorbitol: 1,021; y sacarosa 0,817) [44, 77].

Por otro lado, la exactitud, fue calculada en este trabajo mediante el %R [72], tanto para la técnica (Figura 6) como para la metodología (Figura 10). Utilizando estándares disueltos en acetonitrilo 50%, se destacó en la figura 6 una línea punteada que indica el 100%R, y por tanto, representa un 100% de exactitud en la medición. La condición de HPLC con mayor exactitud es la 19 (Figura 6 y Tabla 6), dado que la media de las concentraciones obtenidas para cada analito  $\pm$  error fue de  $18,02 \pm 0,03$  g/L para fructosa,  $18,217 \pm 0,004$  g/L para sorbitol,  $18,02 \pm 0,08$  g/L para glucosa y  $34,2 \pm 0,2$  g/L para sacarosa, donde se consideró como valor de referencia la concentración del analito del multi estándar de 0,1M.

El %R de la extracción en hojas y raíces mostró que se recupera el  $75 \pm 5\%$  de los azúcares analizados en raíces, mientras que en hojas se recupera cerca del 100% de fructosa y glucosa, aproximadamente el 70% de sacarosa y 80% más de sorbitol sobre lo esperado. El efecto que tiene la matriz sobre los analitos confirma se sobrestima la concentración de fructosa y sorbitol, que puede encontrarse afectado por manitol presente, dado que tienen TR cercanos (Figura 5B). Si se considera que se trabajó con matrices bastante complejas (órganos vegetales), sin material certificado, no es necesario que la recuperación del analito sea del 100%, considerándose una metodología precisa y reproducible al recuperar más del 20% del analito estudiado [78].

Para realizar los análisis de expresión génica se utilizó *RPII* seleccionado por Tong y col. (2009), como un gen de referencia fiable para cuantificar expresión relativa mediante PCR en *P. persica* [69]. Se diseñó partidores específicos para los genes de *SUS1-3*, *INVv2* y *HK3*, los que tienen un efecto importante en la especificidad y sensibilidad de la reacción PCR [67]. Dado que las secuencias de los genomas de F12 y M26 no están depuradas, y se utilizó *P. persica* como genoma guía, para diseñar los partidores utilizados, por lo que se sugiere confirmar que estos son capaces de amplificar los genes de interés, mediante secuenciación del producto de amplificación, comparando la secuencia con secuencias del *Genbank*. [79].

Para la reacción de PCR, Raymaekers y col. (2009) recomiendan partidores con temperatura de *melting* entre 58 – 60 °C, contenido de GC: 30–70%, longitud de 18 a 24 nt, que no tenga más de dos C o G en las últimas cinco posiciones en el extremo 3' y no más de cuatro G constitutivas, ya que es imperativo evitar dímeros de partidores con el fin de evitar amplificaciones no deseadas, las que se pueden identificar en las curvas de *melting* (Figura 14F). Se espera que el producto de amplificación tenga longitud máxima de 400 pb, para mejorar la eficiencia de la reacción [79]. Por otro lado, Abd-Elsalam (2003) recomienda temperatura de *melting* de los partidores entre 52 – 58 °C, es decir, inferior a la recomendada por Raymaekers y col. (2009) [67, 79]. Estos parámetros se consideraron en el diseño de los partidores diseñados (Tabla 8 y 9). Se corroboró ausencia de dímeros, *in silico*, en Oligocal, y experimentalmente, con la presencia de un solo peak en las curvas de *melting* (Figura 14), lo cual se obtuvo con satisfacción [79, 80].

Para los análisis realizados con *SYBR Green*, la temperatura de *melting*, junto con el valor Cq (ciclo de cuantificación), es un parámetro adicional que se debe tener en cuenta [81]. Además, se debe tener presente que el contenido de GC, la temperatura de *melting* y la temperatura *annealing* dependen estrictamente entre sí [67]. Por lo que la verificación de la amplificación se realizó, para temperatura de *annealing* cercanas a las temperatura de *melting*, usando 56 y 57 °C, mediante el análisis de un solo máximo en las curvas de *melting* otorgadas por el programa de AriaMx 3000P, por lo que este trabajo se queda al debe en la confirmación del gen amplificado por estos partidores, ya que la información entregada por las curvas de *melting* indican que el par de partidores es capaz de amplificar un gen, pero no cual, y esto se puede evidenciar mediante secuenciación del producto de amplificación y posterior *BLAST* en la base de dato correspondiente de la especie [79, 81, 67], que en este caso se utilizó Phytozome para *P. persica*, el genoma depurado, con el que se diseñó los partidores para una búsqueda específica para F12 (*P. avium*) se debería utilizar la base de datos del NCBI y la del laboratorio de fisiología del estrés de CEAF para M26 (híbrido *P. cerasifera* × *P. munsoniana*). O bien, también se podría haber corroborado mediante electroforesis en gel de agarosa esperando, encontrar bandas del largo del producto de amplificación, es decir, por debajo de los 400 pb.

La eficiencia del PCR puede tener un impacto significativo sobre la robustez y precisión del análisis [80]. La eficiencia es particularmente importante en los ensayos que se informan los resultados como las veces de cambio del ARNm, para los genes objetivo en relación con el gen de referencia [80], como es el caso de este estudio. Dado que idealmente, la cantidad de templado o hebra guía de ADN, se duplicará durante cada ciclo de

amplificación, en forma exponencial, lo que se traduce en una eficiencia de reacción igual a 2, equivale al 100% de eficiencia [80, 71, 79]. Así al comparar con los resultados resumidos en la Tabla 10, se condicen con los parámetros descritos en literatura, donde Smith (2021) indica que una eficiencia aceptable es entre 90% y 100% [80], permitiendo aseverar que las reacciones de PCR realizadas tienen una alta eficiencia y robustez.

La normalización de los resultados obtenidos se realizó respecto al gen de referencia *RPII*, mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , lo cual permite graficar y comparar los resultados mediante expresión relativa [71, 82, 70].

A partir de las metodologías validadas y estandarizadas, se analizó el metabolismo de sacarosa en hojas y raíces de portainjertos de *Prunus spp.* sensible (F12) y tolerante (M26) injertadas entre ellos.

La mayoría de las plantas sintetizan sacarosa como principal producto fotosintético, el que es usado para la regulación homeostática y el transporte de carbono a larga distancia, dentro de la planta, vía xilema [83, 40]. Además existen especies de plantas, como la familia *Rosaceae*, que utilizan polioles, p. ej. sorbitol [83]. Dado que el género *Prunus* pertenece a esta familia se decidió analizar glucosa, fructosa, sacarosa y sorbitol.

En hojas y raíces ocurre la degradación de carbohidratos para obtener energía en forma de ATP, lo que se da, principalmente a través de respiración aeróbica, permitiendo producir 36 moles de ATP, o bien, mediante vía fermentativa, la cual conduce a la obtención de 2 moles de ATP [18]. Es conocido que, en las plantas, la deficiencia de O<sub>2</sub> reduce drásticamente la eficiencia de producción celular de ATP, producto del cierre de estomas, induciendo la vía

fermentativa, por sobre la respiración aeróbica, la que requiere de O<sub>2</sub> como aceptor final de electrones (Figura 2 y 4) [84, 18].

La degradación de sacarosa puede ocurrir mediante (1) SUS la que degrada sacarosa a fructosa y UDP-glucosa utilizando UTP o (2) INV, la que degrada sacarosa a fructosa y glucosa utilizando H<sub>2</sub>O, así una característica típica del metabolismo de la sacarosa, durante la deficiencia de O<sub>2</sub>, es que se potencia la vía de SUS, ya que se requiere de menor costo energético para generar fosfatos de hexosa, optando así, por la vía más eficiente, energéticamente (Figura 4) [15, 16]. Lo que se cumple para hojas de F12, independiente del portainjerto utilizado y se contradice en M26, ya que tanto hojas como raíces se vio represión de SUS y sobreexpresión de INVv2 (Figura 15-16).

Las combinaciones sometidas a hipoxia, que utilizaron F12 como portainjerto (Figura 11), presentaron aumento de glucosa y fructosa, pero disminución de sacarosa y sorbitol en hojas, lo que está estrechamente relacionado con los antecedentes de tasa fotosintética donde se ha visto disminuida en el genotipo sensible, sumado a los resultados del anexo 7, analizados en el mismo modelo vegetal [21, 17, 20]

Con esta información se esperaría que sacarosa y sorbitol, en hojas de vástagos injertados sobre F12 se vean afectadas negativamente, dado que la “producción” de estos azúcares se ve disminuido, lo que ocurre para sacarosa en Hetero F12 y Homo F12, pero aumenta la concentración de sorbitol, principalmente en Hetero F12, lo cual se puede deber a disminución en el transporte vía xilema, y/o disminuye el metabolismo asociado a sorbitol deshidrogenasa (SDH), sin embargo, no es posible confirmar esta interpretación hasta analizar la expresión génica y/o la actividad de la SDH o de los transportadores de sorbitol

(SOT) en condiciones de hipoxia. Por otra parte, en el caso de Hetero M26 (hojas de F12 sobre portainjerto M26), la concentración de sorbitol disminuye al menos 5,8 mg sorbitol/g hoja entre 6 y 15 días de tratamiento con hipoxia, obteniendo resultados similares para sacarosa, pero en menor magnitud (1,6 mg sacarosa/g hoja), por lo que al suponer que el genotipo de las hojas (F12) disminuye la tasa fotosintética, se justificarían las concentraciones de sacarosa y sorbitol mediante el constante transporte de sorbitol, permitiendo mantener concentraciones en las raíces similares al control, permitiendo también la homeostasis en raíces (Figura 12A).

En cuanto a los resultados, obtenidos a partir de expresión génica, se evidencia represión de *SUS3* y *SUS1* en hojas de vástagos injertados sobre F12, mientras que *SUS2* e *INVv2* presentan sobreexpresión ante el estrés por hipoxia en hojas de Hetero F12 y en el caso del Homo F12 se sobreexpresó *SUS2* y reprimió *INVv2*, lo cual se puede asociar con el comportamiento de sacarosa, glucosa y fructosa, considerando que la metodología utilizada para extraer azúcares no diferencia entre glucosa y sus diferentes especies fosforiladas.

En raíces se evidencia represión del gen *SUS3* y sobreexpresión para *INVv2* en todas las combinaciones, mientras que en Hetero F12 y Homo F12 se sobreexpresa *SUS1* y *SUS2* respectivamente, lo que podría explicar porque estas combinaciones presentan tendencia al aumento de concentración de sacarosa en raíces y disminución en hojas, disminuyendo, además las concentraciones de glucosa y/o fructosa en raíces. Lo que permitiría inferir que estas raíces requieren mayores concentraciones de azúcares respecto a su contraparte M26.

En general, estos resultados se condicen con la revisión de Salvatierra y col. (2020), donde se indica que las plantas sensibles a la hipoxia agotan sus azúcares solubles en condiciones

de inundación, pero que las tolerantes mantienen el nivel (figura 4), para experimentos realizados en M26 y F12 durante 6 a 72 hrs [6]. Y con el estudio realizado por Xie y col. (2021) en portainjertos de cítricos, se identificó sobreexpresión del gen *SUS2*, bajo estrés por hipoxia, sumado a la disminución del contenido de azúcares [19].

Además, estudios realizados por Arismendi y col. (2015), en plantas de M26 y F12 encontraron, 4 isoformas de *SUS* sobre expresadas en condiciones de hipoxia, estos son los homólogos a *P. pérsica* *Prupe.7G192300.4 (SUS1)*, *Prupe.8G264300.1 (SUS3)*, *Prupe.1G131700.1 (SUS2)* y *Prupe.7G192300.1 (SUS1)*. Sumado a esto, en portainjertos de F12, 1 isoforma de *INV*, homólogo a *P. persica: Prupe.1G111800.1*, fue sobre expresada después de 72 hrs. de hipoxia, y 3 isoformas de *INV* homólogos a *P. persica: Prupe.2G277900.1 (INVv2)*, *Prupe.6G122600.1* y *Prupe.6G122600.2*, fueron reprimidos en el transcurso del mismo tiempo. Por otro lado, en portainjertos de M26 mostraron 2 isoformas de *INV*, los homólogos a *P. pérsica Prupe.2G277900.1 (INVv2)* y *Prupe.6G122600.1* fueron reprimidos a 24 y 72 horas de hipoxia [15, 17]. Y por tanto se puede interpretar que el comportamiento de *SUS2* e *INVv2* en hojas ocurre en relación con el genotipo de la hoja y no del portainjerto.

Por otro lado, hay que destacar que en hojas de Homo F12, Hetero F12 y Homo M26, el gen *HK3* no presentó variaciones respecto a su control (Figura 15E), lo cual indicaría que la expresión de este gen se mantiene consistente, frente a estrés por deficiencia de O<sub>2</sub>, se podría inferir que la actividad de la enzima permanece similar a una situación sin estrés, sin embargo, para ello se requiere de un análisis de cinética enzimática para *HK3*, obtenidas a partir de hojas de las combinaciones nombradas en condiciones de hipoxia. Mediante el

análisis de transcriptómica de Arismendi y col. (2015), se evidenció la inducción de más isoformas de *HK* en M26 que en F12, y lo que es destacable, el homólogo a *P. persica Prupe.1G366000 (HK3)*, fue fuertemente sobre expresado en el genotipo tolerante, pero consistentemente reprimido en el sensible durante todo el tratamiento de hipoxia (72 hrs.) [15]. Esto se evidencia de forma opuesta en la combinación Hetero M26, donde *HK3* fue fuertemente sobre expresado en hojas (F12) y levemente reprimido en raíces (M26), su contraparte, Hetero F12 no presenta cambios estadísticamente significativos en hojas o raíces, en lo que respecta a *HK3*. Finalmente, en el caso de ambos homoinjertos, se aprecia, para *HK3* una leve sobreexpresión respecto a su control en hojas y represión en raíces, considerando que en raíces de Homo F12 no hubo amplificación.

Por otra parte, en Homo M26, las concentraciones de glucosa disminuyen en hojas y raíces, pero *HK3* se reprime en ambos órganos, lo que da a suponer que no hay mayor metabolismo hacia glucólisis por *HK3* y que probablemente la represión de *SUS* y sobreexpresión de *INVv2* no son suficientes para mantener la concentración de glucosa similar a la del control, lo cual podría sugerir aumento de glucólisis mediante otras isoformas de *HK*.

El interés de analizar la expresión génica de *HK*, radica en que esta enzima es la única capaz de fosforilar glucosa, por lo que se considera clave en la activación de la glucólisis [15, 17]. Destacando su relevancia para este estudio, dado que la actividad de *HK* ha sido asociada con la regulación de procesos fisiológicos, tales como el cierre de estomas, fotosíntesis en hojas y absorción de minerales por las raíces, que como hemos visto son afectados condiciones de hipoxia radical, y permiten diferenciar entre una especie tolerante o sensible

[17]. Particularmente en este estudio, se escogió analizar expresión génica de *HK3*, para la cual Pérez-Díaz y col. (2021) demostraron que bajo hipoxia radical se vio impulsada la expresión del gen *HK3* desde muy temprano en M26, pero no en F12, lo que sugiere un papel en la respuesta temprana de las raíces a la falta de O<sub>2</sub> [41].

Por otra parte, las concentraciones que se encontraban sobre el LQ en raíces fueron fructosa y glucosa, por lo que se normalizó respecto a su control (Figura 13). En Homo F12 y Hetero M26 la glucosa presenta una concentración mínima y fructosa máxima a los 10 días de tratamiento por hipoxia, diferenciándose en que Homo F12 presentó concentraciones inferiores a su control y Hetero M26 cercanos a los valores de su control (razón hipoxia/control ~ 1). Por otro lado, Homo M26 presenta concentraciones de glucosa en raíz considerablemente inferiores al control con un mínimo a los 10 días de tratamiento y concentraciones de fructosa que decae considerablemente entre 6 y 15 días de tratamiento, en comparación a su control (Figura 13D).

Si bien las concentraciones de sacarosa se encuentran todas bajo el LQ, hizo un estimativo siguiendo la tendencia entregada al normalizar con su control. Como se muestra en la Figura 13, donde se aprecia que el comportamiento es opuesto al de las concentraciones de sacarosa en hojas para sus mismas combinaciones, lo cual podría indicar el transporte de este azúcar desde las hojas a las raíces, donde este proceso podría ser la etapa crítica para diferenciar entre un genotipo sensible y tolerante a hipoxia.

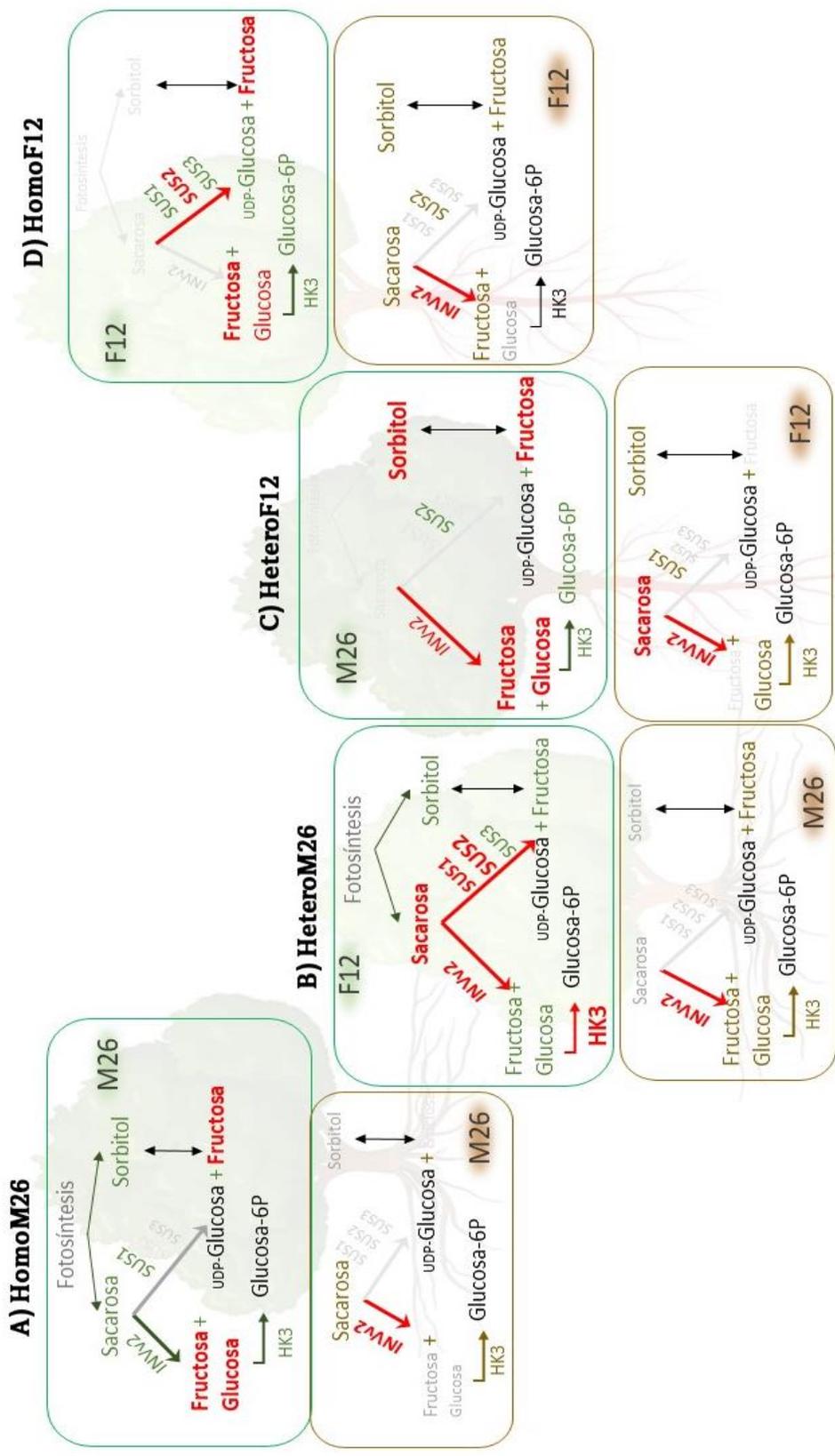
En cuanto a las concentraciones de sorbitol en raíces, para todas las combinaciones, exceptuando Homo F12, se comporta en el transcurso del tiempo igual al sorbitol en hojas de su combinación, pero con concentraciones inferiores al control, opuesto a lo que ocurre

en hojas. En Homo F12 a pesar de que la concentración de sorbitol en hojas aumenta considerablemente a los 15 días de hipoxia, en raíces esta disminuye, lo que se podría asociar con el daño fenotípico que se aprecia en estas combinaciones luego de 15 días.

En raíces, las concentraciones medidas fueron inferiores al LQ, lo cual puede ser mejorado reemplazando o acoplando otra columna cromatográfica, otra opción sería acoplar un detector posterior al DIR, o bien mediante una técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) con la cual sería posible identificar cada compuesto extraído a través de esta metodología.

Como bien se ha mencionado anteriormente, las raíces son el órgano que se ve afectado en primera instancia, frente a hipoxia [15, 39, 85]. Se ha reportado que una respuesta en diferentes especies frutales, es el cambio de metabolismo de INV a SUS, sin embargo, en el presente trabajo se evidenció que tanto en raíces de M26 como de F12, se sobreexpresó *INVv2*, sumado a la represión de *SUS3* en raíces de ambos genotipos, *SUS1* se sobreexpresó en raíces Hetero F12 y se reprime en las otras combinaciones, a pesar de que se ha evidenciado sobreexpresión de este gen a los 3 días en ambos genotipos sin injertar, y *SUS2* se sobreexpresó en Homo F12 y se reprime en las otras combinaciones [17, 15].

Por tanto, frente a los antecedentes plasmados en esta tesis, aún falta información para aseverar que M26 tiene menor requerimiento energético que su contraparte, pero todo pareciera indicar que el metabolismo radical, de los carbohidratos, es clave en la tolerancia a hipoxia, ya que independiente del comportamiento como individuo, del genotipo injertado, es la raíz el órgano que censa y responde a la hipoxia, sin embargo pareciera que si el injerto



**Figura 17. Esquema resumen, del metabolismo de la sacarosa en hojas y raíces de combinaciones de Mariana 2624 (M26) y Mazzard F12/1 (F12) en respuesta a hipoxia.** Se representa el modelo vegetal utilizado en este trabajo, indicando como se afecta el metabolismo de sacarosa en raíces (cuadro café) y hojas (cuadro verde) para combinaciones denominadas Homo M26 (A), Hetero M26 (B), Hetero F12 (C) y Homo F12 (D). Destacando en rojo los aumentos de concentración o expresión, en gris las disminuciones de concentración o expresión y en negro aquellas vías que se desconoce su comportamiento. El

es tolerante al estrés la respuesta es menos exigente para la síntesis de carbohidratos en hojas, es por esto que en el presente trabajo se plantea como recomendación la utilización de portainjertos e injertos (o variedad), tolerantes al estrés por hipoxia para optimizar la producción frutícola en zonas que se vean afectadas constantemente por condiciones de hipoxia.

En resumen (Figura 17), se encontró menor concentraciones de sacarosa y sorbitol, en raíces de M26 respecto a F12, manteniendo las concentraciones en hojas. Mientras que las concentraciones de hexosas en todas las combinaciones se mantienen o aumentan en hoja y se mantienen o disminuyen en raíces. Además, en raíces, la sobreexpresión de INVv2 para las 4 combinaciones, represión de las 3 SUS analizadas en M26, represión de 2 SUS en F12 y no se observaron cambios para HK3. Mientras que en hojas, se sobreexpresó INVv2 en las combinaciones heteroinjertos, se aprecia sobreexpresión de SUS en hojas de F12, represión de 2 SUS en M26 y sobreexpresión de HK3 en hojas de F12 injertadas sobre M26.

Mediante estos resultados se infiere translocación de sacarosa y/o sorbitol desde hojas a raíces, evidenciando comunicación o distribución de los azúcares entre el vástago y el portainjerto, según la tolerancia o sensibilidad de este último al estrés por hipoxia. Puede ser comandada principalmente por la capacidad del vástago de generar estos carbohidratos en condiciones de deficiencia de O<sub>2</sub> o bien de transportar azúcares hasta las raíces del portainjerto. Esto se justifica, principalmente, mediante los resultados de sacarosa y sorbitol, los principales productos de la fotosíntesis, proceso que se ve fuertemente perjudicado en hipoxia, debido al cierre de estomas ocasionado por la escase de O<sub>2</sub>, además la disminuye la

clorofila, otro rasgo importante, que permiten la síntesis de carbohidratos mediante fotosíntesis [6, 12, 20, 21].

Por último, para comprender en mayor medida como el estrés por hipoxia afecta al metabolismo de los carbohidratos en hojas y raíces, se recomienda complementar este estudio con análisis mediante LC-MS o HPLC-IR acoplado a detector de arreglo de diodos (DAD), el que registra el espectro de cada soluto, con el fin de identificar los diferentes tipos de hexosas fosforiladas. Sumado a esto, analizar el comportamiento de expresión génica de la *SDH*, así como la actividad enzimática para *SUS*, *INV*, *HK*, entre otras enzimas claves del metabolismo como puede ser *SDH*, *FK*, *PGM*.

## CONCLUSIÓN

Se puede concluir que en primer lugar, validar la metodología a utilizar es un proceso necesario para identificar las ventajas y limitaciones, de tal forma que las cifras de mérito demostradas corroboren la veracidad de los resultados obtenidos, en este caso de concentraciones de azúcares y la expresión relativa a RPII en hojas y raíces de *Prunus spp.* Para esta última se verificó sensibilidad y eficiencia, quedando al pendiente la corroboración experimental mediante secuenciación del producto de amplificación comparándolos con los genomas de M26 y F12 una vez depurados, ya que este análisis se realizó *in silico* mediante BLAST en la base de dato del NCBI, encontrando los genes de interés en distintas especies de *Prunus spp.*

Esta tesis comenzó con la premisa de que “el portainjerto de *Prunus sp.* Mariana 2624 (M26), tolerante a hipoxia radical, tiene un menor requerimiento energético en comparación a su contraparte sensible, Mazzard F12/1 (F12), permitiendo la sobrevida de la planta injertada”, la cual mediante los resultados obtenidos se puede afirmar que raíces de M26 presentan menores concentraciones de sacarosa y sorbitol, las que se ven disminuidas en F12, además, reprime fuertemente a las 3 *SUS* y sobreexpresó *INVv2*, independiente si el vástago es del genotipo tolerante (M26) o sensible (F12), además, raíces de F12 mantienen la expresión de al menos una *SUS* y las hojas de las 3 *SUS* analizadas, junto con la sobreexpresión de *INVv2*.

Finalmente, como se resume en la Figura 17, se puede deducir que el portainjerto M26 mantiene la actividad metabólica basal, dado que puede operar con bajas concentraciones de sacarosa y sorbitol, mientras mantiene o aumenta las concentraciones de azúcares en hojas y

la tasa fotosintética, en comparación con F12. Así los resultados sugieren un mecanismo, entre portainjerto/vástago, probablemente, dado por el transporte de sacarosa y/o sorbitol desde hojas a raíces. En conclusión, las raíces del genotipo tolerante (M26), son más económicas energéticamente, respecto al genotipo sensible (F12).

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Pefaur Lepe, «Boletín de fruta, enero 2023,» 12 enero 2023. [En línea]. Available: <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletines/boletin-de-fruta-enero-2023>. [Último acceso: 15 febrero 2023].
- [2] S. Soza-Amigo, C. Mancilla y L. M. Ferrada, «El sector silvoagropecuario y su contribución al desarrollo en los principales centros nodales de la Patagonia chilena en los años 2012 y 2007,» *Idesia*, vol. 35, n° 3, pp. 81 - 92, 2017.
- [3] L. Yañez Barrios, «Ficha nacional, actualización diciembre 2022,» 2022.
- [4] L. Yañez Barrios, «Ficha Nacional,» 2021.
- [5] T. McGee, M. Shahid, T. G. Beckman, J. X. Chaparro, B. Schaffer y A. Sarkhosh, «Physiological and biochemical characterization of six Prunus rootstocks in response to flooding,» *Environmental and Experimental Botany*, vol. 183, 2021.
- [6] A. Salvatierra, P. Pimentel, R. Almada y P. Hinrichsen, «Exogenous GABA application transiently improves the tolerance to root hypoxia on a sensitive genotype of Prunus rootstock,» *Environmental and Experimental Botany*, vol. 125, pp. 52 - 66, 2016.
- [7] PROCISUR, «El riego en los países del Cono Sur. Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur,» Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), Montevideo, 2010.
- [8] E. J. Warschefsky, L. L. Klein, M. H. Frank, D. H. Chitwood, J. P. Londo, E. J. von Wettberg y A. J. Miller, «Rootstocks: diversity, domestication, and impacts on shoot phenotypes,» *Trends in plant science*, vol. vol. 21, n° No. 5, pp. 418-437, Mayo 2016.
- [9] M. C. Martínez-Ballesta, C. Alcaraz-López, B. Muries, C. Mota-Cadenas y M. Carvajal, «Physiological aspects of rootstock–scion interactions,» *Scientia Horticulturae*, pp. 112-118, 2010.
- [10] F. Gainza, I. Opazo y C. Muñoz, «Graft incompatibility in plants: Metabolic changes during formation and establishment of the rootstock/scion union with emphasis on Prunus species,» *Chilean Journal of Agricultural Research*, pp. 28 - 34, 2015.
- [11] I. Opazo, G. Toro, A. Salvatierra, C. Pastenes y P. Pimentel, «Rootstocks modulate the physiology and growth responses to water deficit and long-term recovery in grafted stone fruit trees,» *Agricultural Water Management*, vol. 228, 2020.
- [12] V. H. Ziegler, E. Ploschuk, A. Weibel y P. Insauri, «Short-term responses to flooding stress of three Prunus rootstocks,» *Scientia Horticulturae*, vol. 224, pp. 135 - 141, 2017.
- [13] E. Najt, C. Arjona, M. Ojer, G. Reginato y A. Weibel, «Portainjertos y calidad de plantas,» de *Producción de duraznos para industria*, Mendoza, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo, 2011, pp. 17-28.
- [14] M. Moreno, M. Tabuenca y R. Cambra, «Adara, A plum rootstock for cherries and other stone fruit species,» *HortScience*, vol. 30, n° 6, pp. 1316-1317, 1995.
- [15] A. Salvatierra, G. Toro, P. Mateluna, I. Opazo, M. Ortiz y P. Pimentel, «Keep Calm and Survive: Adaptation Strategies to Energy Crisis in Fruit Trees under Root Hypoxia,» *Plants*, vol. 9, 2020.
- [16] M. Keller, «Environmental Constraints and Stress Physiology,» de *The Science of Grapevines: Anatomy and Physiology*, 2010, pp. 227 - 310.
- [17] M. J. Arismendi, R. Almada, P. Pimentel, A. Bastias, A. Salvatierra, P. Rojas, P. Hinrichsen, M. Pinto, A. Di Genova, D. Travisany, A. Maass y B. Sagredo, «Transcriptome sequencing of Prunus sp. rootstocks roots to identify candidate genes involved in the response to root hypoxia,» *Tree Genetics & Genomes*, 2015.
- [18] E. Loreti y P. Perata, «The Many Facets of Hypoxia in Plants,» *Plants*, vol. 9, n° 745, 2020.
- [19] R. Xie, L. Zheng, Y. Jiao y X. Huang, «Understanding physiological and molecular mechanisms of citrus rootstock seedlings in response to root zone hypoxia by RNA-Seq,» *Environmental and Experimental Botany*, vol. 192, 2021.
- [20] G. Toro, M. Pinto y P. Pimentel, «Root respiratory components of Prunus spp. rootstocks under low oxygen: Regulation of growth, maintenance, and ion uptake respiration,» *Scientia Horticulturae*, vol. 239, pp. 259-368, 2018.

- [21] P. Pimentel, R. D. Almada, A. Salvatierra, G. Toro, M. J. Arismendi, M. T. Pino, B. Sagredo y M. Pinto, «Physiological and morphological responses of Prunus species with different degree of tolerance to long-term root hypoxia,» *Scientia Horticulturae*, vol. 180, pp. 14-23, 2014.
- [22] M. Calvo-Polanco, J. Señorans y J. J. Zwiazek, «Role of adventitious roots in water relations of tamarack (*Larix laricina*) seedlings exposed to flooding,» *BioMed Central Plant Biology*, pp. 1471-2229, 2012.
- [23] M. M. Arbo y A. M. Gonzalez, «Botánica Morfológica,» 2019. [En línea]. Available: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema11/11-4aerenquima.htm>. [Último acceso: 19 11 2021].
- [24] A. Hossain, S. Maitra, B. Pramanick, K. L. Bhutia, Z. Ahmad, D. Moulik, M. A. Syed, T. Shankar, M. Adeel, M. M. Hassan y T. Aftab, «Wild relatives of plants as sources for the development of abiotic stress tolerance in plants,» de *Plant Perspectives to Global Climate Changes*, Academic Press, 2022, pp. 471-518.
- [25] W. Armstrong, P. M. Beckett, T. D. Colmer, T. L. Setter y H. Greenway, «Tolerance of roots to low oxygen: 'Anoxic' cores, the phytohemoglobin-nitric oxide cycle, and energy or oxygen sensing,» *Journal of Plant Physiology*, pp. 92-108, 2019.
- [26] G. Le Provost, C. Sulmon, J. M. Frigerio, C. Bodénès, A. Kremer y C. Plomion, «Role of waterlogging-responsive genes in shaping interspecific differentiation between two sympatric oak species,» *Tree Physiology*, vol. 32, pp. 119 - 134, 2011.
- [27] M. F. Hohmann-Marriott y R. E. Blankenship, «The Photosynthetic World,» de *Photosynthesis Plastid Biology, Energy Conversion and Carbon Assimilation*, Springer, 2012.
- [28] D. L. Nelson y M. M. Cox, Lehninger. Principios de Bioquímica, 5ta Ed. ed., Ediciones Omega, 2009.
- [29] J. Kreuzwieser, J. Hauberg, K. A. Howell, A. Carroll, H. Rennenberg, A. H. Millar y J. Whelan, «Differential Response of Gray Poplar Leaves and Roots Underpins Stress Adaptation during Hypoxia,» *Plant Physiology*, vol. 149, pp. 461 - 473, 2009.
- [30] J. Kreuzwieser y H. Rennenberg, «Molecular and physiological responses of trees to waterlogging stress,» *Plant, Cell and Environment*, vol. 37, p. 2245–2259, 2014.
- [31] G. Toro y M. Pinto, «Plant respiration under low oxygen,» *CHILEAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH*, n° 75, pp. 57 - 70, 2015.
- [32] M. J. Rubio-Cabetas, C. Pons, B. Bielsa, M. L. Amador, C. Martí y A. Granell, «Preformed and induced mechanisms underlies the differential responses of Prunus rootstock to hypoxia,» *Journal of Plant Physiology*, vol. 228, pp. 134-149, 2018.
- [33] B. J. Reeksting, N. Coetzer, W. Mahomed, J. Engelbrecht y N. van den Berg, «De Novo Sequencing, Assembly, and Analysis of the Root Transcriptome of *Persea americana* (Mill.) in Response to *Phytophthora cinnamomi* and Flooding,» *PLoS ONE*, vol. 9, n° 2, 2014.
- [34] B. Ruperti, A. Botton, F. Popullin, G. Eccher, M. Brilli, S. Quaggiotti, S. Trevisan, N. Cainelli, P. Guarracino, E. Schievano y F. Meggio, «Flooding Responses on Grapevine: A physiological, transcriptional, and metabolic perspective,» *Frontiers in Plant Science*, vol. 10, n° 339, 2019.
- [35] H. Zhao, S. Sun, L. Zhang, J. Yang, Z. Wang, F. Ma y M. Li, «Carbohydrate metabolism and transport in apple roots under nitrogen deficiency,» *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 155, pp. 455-463, 2020.
- [36] N. Aoki, T. Hirose y R. T. Furbank, «Sucrose Transport in Higher Plants: From Source to Sink,» de *Photosynthesis*, Springer, 2012, pp. 703-729.
- [37] J. Yoon, L.-H. Cho, W. Tun, J.-S. Jeon y G. An, «Sucrose signaling in higher plants,» *Plant Science*, 2020.
- [38] R. F. Baker, K. A. Leach y D. M. Braun, «SWEET as Sugar: New Sucrose Effluxers in Plants,» *Molecular Plant*, vol. 5, n° 4, pp. 766-768, 2012.
- [39] J. Bailey-Serres, T. Fukao, D. J. Gibbs, M. J. Holdsworth, S. C. Lee, F. Licausi, P. Perata, L. A. Voesenek y J. T. v. Dongen, «Making sense of low oxygen sensing,» *Trends in Plant Scienc*, vol. 17, n° 3, pp. 129-138, 2012.
- [40] C. K. Mathews, K. E. Van Holde y K. G. Ahern, Bioquímica, 3era ed., Madrid: Pearson Educación, 2002, pp. 311-351, 501-699.
- [41] J. Pérez-Díaz, W. Batista-Silva, R. Almada, D. Medeiros, S. Arrivault, F. Correa, A. Bastias, P. Rojas, M. F. Beltrán, M. F. Pozo, W. L. Araújo y B. Sagredo, «Prunus Hexokinase 3 genes alter primary C-metabolism and promote drought and salt stress tolerance in Arabidopsis transgenic plants,» *Scientific Reports*, vol. 11, 2021.
- [42] F. Gainza, I. Opazo, V. Guajardo, P. Meza, M. Ortiz, J. Pinochet y C. Muñoz, «Rootstock breeding in Prunus species: Ongoing efforts and new challenges,» *Chilean journal of agricultural research*, pp. 6 -16, 2015.
- [43] A. Salazar, J. Torrents, M. Bordas, J. Val y M. Moreno, «Graft compatibility for new released Prunus rootstocks,» *Acta orticulture*, pp. 175-180, 2018.

- [44] O. A. Quattrocchi, S. A. de Andrizzi y R. F. Laba, *Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica*, Buenos Aires: Artes Gráficas Farro SA, 1992.
- [45] B. Razmilic, «Principios básicos de cromatografía,» de *Control de calidad de insumos y dietas acuícolas*, E. C. Campos, Ed., Santiago de Chile, 1994.
- [46] Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, «Manual de Inocuidad y Certificación,» Febrero 2018. [En línea]. Available: [http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/f59\\_guia\\_de\\_validaciones\\_de\\_metodos\\_analiticos\\_08.02.18.pdf](http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/f59_guia_de_validaciones_de_metodos_analiticos_08.02.18.pdf). [Último acceso: 20 enero 2023].
- [47] A. C. Foitzich Molina, «Desarrollo y validación de una metodología para determinar azúcares simples en matrices orgánicas mediante HPLC-IR,» Valdivia-Chile, 2013.
- [48] A. Komatsu, T. Moriguchi, K. Koyama, M. Omura y T. Akihama, «Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships,» *Journal of Experimental Botany*, vol. 53, n° 366, pp. 61-71, 2002.
- [49] J.-I. Cho, H.-B. Kim, C.-Y. Kim, T.-R. Hahn y J.-S. Jeon, «Identification and characterization of the duplicate rice sucrose synthase genes OsSUS5 and OsSUS7 which are associated with the plasma membrane,» *Molecules and cells*, pp. 553-561, 2011.
- [50] S. Baud, M.-N. Vaultier y C. Rochat, «Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in Arabidopsis,» *Journal of experimental botany*, vol. 55, n° 396, pp. 397-409, 2004.
- [51] M. Volpicella, I. Fenizza, C. Leoni, A. Gadaleta, D. Nigro, B. Gattulli, G. Mangini, A. Blanco y L. R. Ceci, «Identification and characterization of the sucrose synthase 2 gene (Sus2) in Durum Wheat,» *Frontiers in Plant Science*, 2016.
- [52] Z. Bieniawska, D. H. P. Barratt, A. P. Garlick, V. Thole, N. Kruger, C. Martin, R. Zrenner y A. M. Smith, «Analysis of the sucrose synthase gene family in Arabidopsis,» *The plant Journal*, pp. 810 - 828, 2007.
- [53] X. An, Z. Chen, J. Wang, M. Ye, L. Ji, J. Wang, W. Liao y H. Ma, «Identification and characterization of the Populus sucrose synthase gene family,» *Gene*, vol. 539, pp. 58-67, 2014.
- [54] M. Li, F. Feng y L. Cheng, «Expression Patterns of Genes Involved in Sugar Metabolism and Accumulation during Apple Fruit Development,» *PLoS ONE*, vol. 7, n° 3, 2012.
- [55] H.-Z. Yuan, F.-h. Pang, W.-j. Cai, X.-d. Chen, M.-z. Zhao y H.-m. Yu, «Genome-wide analysis of the invertase genes in strawberry (Fraria X ananassa),» *Journal of integrative agriculture*, pp. 2652-2665, 2021.
- [56] W. Qian, C. Yue, Y. Wang, H. Cao, N. Li, L. Wang, X. Hao, X. Wang, B. Xiao y Y. Yang, «Identification of the invertase gene family (INVs) in tea plant and their expression analysis under abiotic stress,» *Plant Cell Rep*, pp. 2269-2283, 2016.
- [57] S. Juárez-Colunga, C. López-González, N. C. Morales-Elías, J. A. Massange-Sánchez, S. Trachsel y A. Tiessen, «Genome-wide analysis of the invertase gene family from maize,» *Plant Molecular Biology*, pp. 385-406, 2018.
- [58] S. Zhang, Z. Zhang, X. Sun, Z. Liu, M. Ma, J. Fan, W. Luo, L. Wang y S. Zhang, «Identification and characterization of invertase family genes reveal their roles in vacuolar sucrose metabolism during Pyrus bretschneideri Rehd. fruit development,» *Genomics*, pp. 1087-1097, 2021.
- [59] Z. Chen, K. Gao, X. Su, P. Rao y X. An, «Genome-Wide Identification of the Invertase Gene Family in Populus,» *PLOS ONE*, 2015.
- [60] J.-I. Cho, S.-K. Lee, S. Ko, H.-K. Kim, S.-H. Jun, Y.-H. Lee, S. H. Bhoo, K.-W. Lee, G. An, T.-R. Hahn y J.-S. Jeon, «Molecular cloning and expression analysis of the cell-wall invertase gene family in rice (Oryza sativa L.),» *Plant Cell Rep*, vol. 24, pp. 225-236, 2005.
- [61] W. Zheng, Y. Zhang, Q. Zhang, R. Wu, X. Wang, S. Feng, S. Chen, C. Lu y L. Du, «Genome-Wide identification and characterization of hexokinase genes in Moso Bamboo (Phyllostachys edulis),» *Frontiers in plant Science*, 2020.
- [62] H. Wang, H. Xin, J. Guo, Y. Gao, C. Liu, D. Dai y L. Tang, «Genome-Wide screening of hexokinase gene family and functional elucidation of HXK2 response to cold stress in Jatropha curcas,» *Molecular Biology Reports*, pp. 1649-1660, 2019.
- [63] L.-C. Zhu, J. Su, Y.-r. Jin, H.-y. Zhao, X.-c. Tian, C. Zhang, F.-w. Ma, M.-j. Li y B.-q. MA, «Genome-wide identification, molecular evolution, and expression divergence of the hexokinase gene family in apple,» *Journal of integrative agriculture*, pp. 2112 - 2125, 2021.

- [64] B. Zhao, K. Qi, X. Yi, G. Chen, X. Liu, X. Qi y S. Zhang, «Identification of hexokinase family members in pear (*Pyrus X bretschneideri*) and functional exploration of PbHXK1 in modulating sugar content and plant growth,» *Gene*, 2019.
- [65] Z. Zhang, J. Zhang, Y. Chen, R. Li, H. Wang, L. Ding y J. Wei, «Isolation, structural analysis, and expression characteristics of the maize (*Zea mays* L.) hexokinase gene family,» *Mol. Biol. Rep.*, 2014.
- [66] M. Han, X. Xu, Y. Xiong, H. Wei, K. Yao, T. Huang, Y. Long y T. Su, «Genome-Wide Survey and Expression Analyses of Hexokinase Family in Poplar (*Populus trichocarpa*),» *Plants*, vol. 11, 2022.
- [67] K. A. Abd-Elsalam, «Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design,» *African Journal of Biotechnology*, vol. 2, n° 5, pp. 91 - 95, 2003.
- [68] S. Chang, J. Puryear y J. Cairney, «A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees,» *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 11, n° 2, pp. 113-116, 1993.
- [69] Z. Tong, Z. Gao, F. Wang, J. Zhou y Z. Zhang, «Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR,» *BioMed Central Molecular biology*, vol. 10, n° 71, pp. 1471-2199, 2009.
- [70] M. W. Pfaffl, «A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR,» *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, n° 9, pp. 2002-2007, 2001.
- [71] K. J. Livak y T. D. Schmittgen, «Analysis of Relative Gene Expression Data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-delta delta</sup> Ct method,» *Methods*, vol. 25, pp. 402 - 408, 2001.
- [72] EuroLab España. P.P. Morillas y colaboradores, Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados, 1a ed. ed., 2016.
- [73] M. Thompson, S. L. R. Ellison y R. Wood, «Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report),» *Pure Appl. Chem.*, vol. 74, n° 5, pp. 835 - 855, 2002.
- [74] International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), *JCGM 200:2012*, 3a ed. ed., 2008.
- [75] J. Rivera y E. Lima, «Efecto desorbedor del metanol en la membrana celular,» *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 16, n° 2, pp. 93 - 97, 2013.
- [76] S. Jiménez, J. Dridi, D. Gutiérrez, D. Moret, J. J. Irigoyen, M. A. Moreno y Y. Gogorcena, «Physiological, biochemical and molecular responses in four *Prunus* rootstocks submitted to drought stress,» *Tree Physiology*, vol. 33, pp. 1061-1075, october 2013.
- [77] R. Hadjikinova, N. Petkova, D. Hadjikinov, P. Dever y D. Hrusavov, «Development and Validation of HPLC-RID method for Determination of Sugars and Polyols,» *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 9, n° 8, pp. 1263-1269, 2017.
- [78] Sección de Laboratorio y Asuntos Científicos de la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito, «Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos,» febrero 2010. [En línea]. Available: [https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation\\_Manual\\_STNAR41\\_Ebook\\_S.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf). [Último acceso: 04 mayo 2023].
- [79] M. Raymaekers, R. Smets, B. Maes y R. Cartuyvels, «Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays,» *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, vol. 23, pp. 145 - 151, 2009.
- [80] M. Smith, «Validating Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assays,» *Encyclopedia of Virology*, vol. 5, 2021.
- [81] S. Broeders, I. Huber, L. Grohmann, G. Berben, I. Taverniers, M. Mazzara, N. Roosens y D. Morisset, «Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods,» *Trends in Food Science & Technology*, vol. 37, pp. 115 - 126, 2014.
- [82] X. Rao, X. Huang, Z. Zhou y X. Lin, «An improvement of the 2<sup>-delta delta</sup> CT method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis,» *Biostat Bioinforma Biomath*, vol. 3, n° 3, pp. 71 - 85, 2013.
- [83] K. Shiratake, «Genetics of Sucrose Transporter in Plants,» *Genes, Genomes and Genomics*, vol. 1, n° 1, pp. 73 - 80, 2007.
- [84] T. Fukao y J. Bailey-Serres, «Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act?,» *TRENDS in Plant Science*, vol. 9, n° 9, pp. 449-456, 2004.
- [85] F. Habibi, T. Lui, M. A. Shahid, B. Schaffer y A. Sarkhosh, «Physiological, biochemical, and molecular responses of fruit trees to root zone hypoxia,» *Environmental and Experimental Botany*, vol. 206, 2023.
- [86] R. C. Edgar, «MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput,» *Nucleic Acids Research*, vol. 32, n° 5, pp. 1792 - 1797, 2004.

- [87] N. Saitou y M. Nei, «The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees,» *Molecular Biology and Evolution*, vol. 4, pp. 406-425, 1987.
- [88] K. Taruma, G. Stecher y S. Kumar, «MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11,» *Molecular Biology and Evolution*, vol. 38, n° 7, pp. 3022-3027, 2021.
- [89] H. Manoochehri, N. F. Hosseini, M. Saidijam, M. Taheri, H. Rezae y F. Nouri, «A review on invertase: Its potentials and applications,» *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020.
- [90] X. Ji, W. Van den Ende, A. Van Laere, S. Cheng y J. Bennett, «Structure, Evolution, and Expression of the Two Invertase Gene Families of Rice,» *Journal of Molecular Evolution*, pp. 615-634, 2005.
- [91] E. Cabral, S. Casco, A. Cabaña, D. Cardoso, W. Medina, R. Salas, O. Ferber, S. Martín, L. Queiroz, D. Cian, E. Lopéz y L. Miguel, «Core Eudicotiledóneas Clado Rosides,» 2010.
- [92] L.-B. Shen, Y. Yao, H. He, Y.-L. Qin, Z.-J. Liu, W.-X. Liu, Z.-Q. Qi, L.-J. Yang, Z.-M. Cao y Y. Yang, «Genome-Wide identification, expression, and functional analysis of the alkaline/neutral invertase gene family in pepper,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, n° 224, 2018.
- [93] L.-B. Shen, QinYu-Ling, Z.-Q. Qi, Y. Niu, Z.-J. Liu, W.-X. Liu, H. He, Z.-M. Cao y Y. Yang, «Genome-wide analysis, expression profile, and characterization of the acid invertase gene family in Pepper,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, n° 15, 2019.
- [94] V. H. Olavarria Contreras, «Montaje y Validación de un Procedimiento HPLC-IR para Determinar y Cuantificar Mioinositol y Ácido Fítico en Matrices Vegetales,» Valdivia - Chile, 2005.
- [95] L. Téllez, F. Arévalo, H. Juárez, P. Altamirano, K. Ccpa, J. Chávez y L. Visitación, «Determinación de timol y carvacrol en hojas de orégano por HPLC FL,» *Revista de la Sociedad Química del Perú*, vol. 80, n° 4, pp. 279 - 286, 2014.

# ANEXOS

## Anexo 1. Condiciones de HPLC evaluadas

Tabla 10. Resumen de las 19 condiciones de HPLC evaluadas en este trabajo

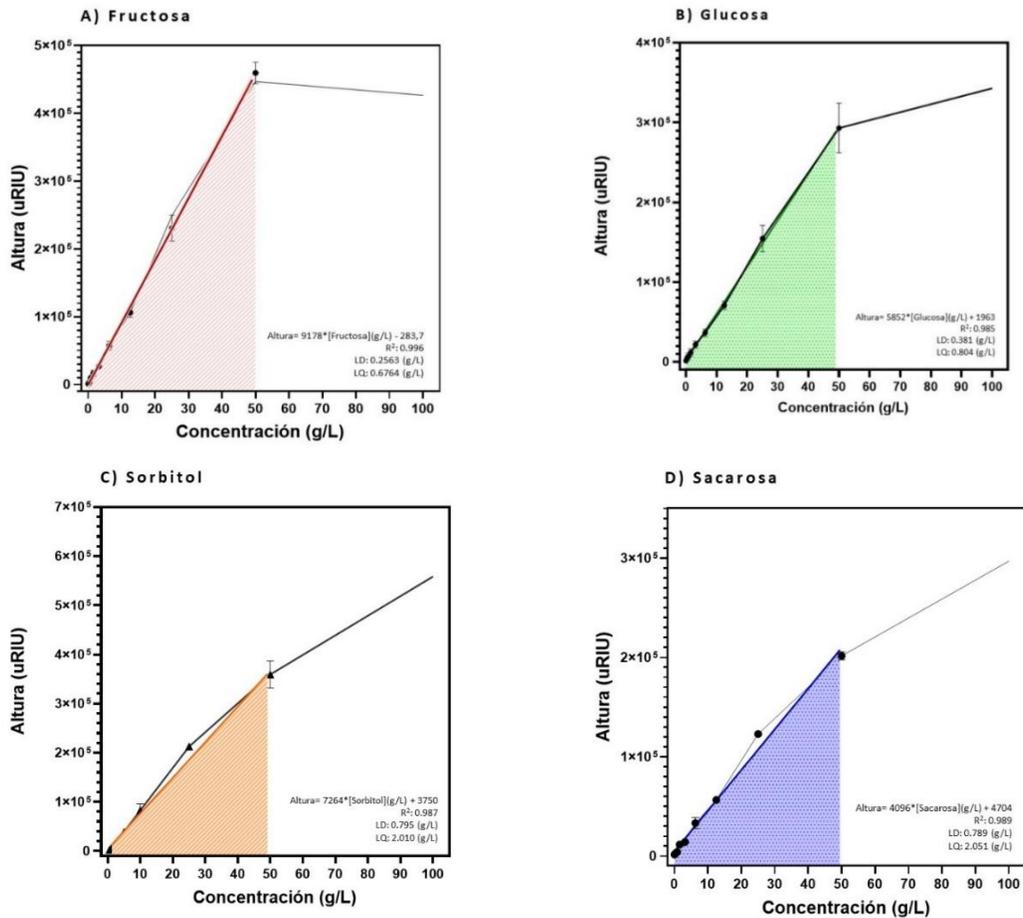
	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición 4
<b>Parámetros</b>				
Columna	Ultra amino 3µm 150 x 4,6 mm. Restek	Ultra amino 3µm 150 x 4,6 mm. Restek	Ultra amino 3µm 150 x 4,6 mm. Restek	Ultra amino 3µm 150 x 4,6 mm. Restek
Pre-columna	ultra amino 10 x 4,0 mm Restek			
Fase móvil	Acetonitrilo 70%	Acetonitrilo 75%	Acetonitrilo 75%	Acetonitrilo 70%
Flujo	0,6 ml/min	1,4 ml/min	1,0 ml/min	1,0 ml/min
Temperatura horno y DIR	30°C	30°C	30°C	30°C
Volumen de inyección	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Tiempo de corrida	17 min.	12 min.	15 min.	10 min.
<b>Resolución</b>				
Rs Fructosa-Sorbitol	1,32	1,08	0,92	0,46
Rs Sorbitol-Glucosa	0,00	0,00	0,00	0,00
Rs Glucosa- Sacarosa	3,47	2,44	2,57	1,22

	Condición 5	Condición 6	Condición 7	Condición 8
<b>Parámetros</b>				
Columna	Ultra amino 3µm 150 x 4,6 mm. Restek	NH2P-40 3E Shodex	NH2P-40 3E Shodex	NH2P-40 3E Shodex
Pre-columna	ultra amino 10 x 4,0 mm Restek	ultra amino 10 x 4,0 mm Restek	ultra amino 10 x 4,0 mm Restek	ultra amino 10 x 4,0 mm Restek
Fase móvil	Acetonitrilo 75%	Acetonitrilo 75%	Acetonitrilo 80%	Acetonitrilo 80%
Flujo	1 ml/min	0,35 ml/min	0,5 ml/min	0,35 ml/min
Temperatura horno y DIR	40°C	40 °C	40 °C	40 °C
Volumen de inyección	20 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Tiempo de corrida	15 min	17 min.	18 min.	25 min.
<b>Resolución</b>				
Rs Fructosa-Sorbitol	1,71	1,20	0,78	0,90
Rs Sorbitol-Glucosa	0,00	1,18	1,46	1,74
Rs Glucosa- Sacarosa	3,51	1,98	3,91	4,26

	Condición 9	Condición 10	Condición 11	Condición 12
<b>Parámetros</b>				
Columna	NH2P-40 3E Shodex	NH2P-40 3E Shodex	NH2P-40 3E Shodex	NH2P-40 3E Shodex
Pre-columna	ultra amino 10 x 4,0 mm Restek			
Fase móvil	Acetonitrilo 80%	Acetonitrilo 80%	Acetonitrilo 80%	Acetonitrilo 80%
Flujo	0,3 ml/min	0,3 ml/min	0,4 ml/min	0,4 ml/min
Temperatura horno y DIR	40 °C	40 °C	40 °C	40 °C
Volumen de inyección	5 µl	10 µl	10 µl	20 µl
Tiempo de corrida	25 min.	25 min.	19 min.	23 min.
<b>Resolución</b>				
Rs Fructosa-Sorbitol	0,69	0,68	0,99	0,81
Rs Sorbitol-Glucosa	1,31	0,99	1,52	1,02
Rs Glucosa- Sacarosa	2,11	1,93	3,71	3,20

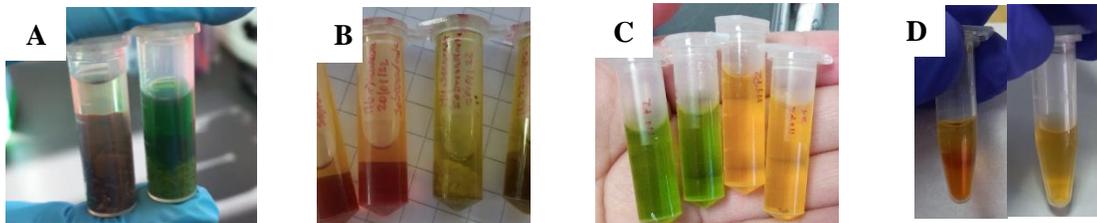
	Condición 13	Condición 14	Condición 15	Condición 16
<b>Parámetros</b>				
Columna	NH2P-40 3E Shodex	NH2P-40 3E Shodex	NH2P-40 3E Shodex	NH2P-40 3E Shodex
Pre-columna	NH2P-50G 3A Shodex	NH2P-50G 3A Shodex	NH2P-50G 3A Shodex	NH2P-50G 3A Shodex
Fase móvil	Acetonitrilo 80%	Acetonitrilo 85%	Acetonitrilo 80%	Acetonitrilo 83%
Flujo	0,28 ml/min	0,25 ml/min	0,35 ml/min	0,35 ml/min
Temperatura horno y DIR	45°C	45°C	45°C	45°C
Volumen de inyección	10 µl	20 µl	20 µl	10 µl
Tiempo de corrida	45 min.	40 min.	18 min.	25 min.
<b>Resolución</b>				
Rs Fructosa-Sorbitol	0,98	1,25	0,61	1,16
Rs Sorbitol-Glucosa	2,91	1,59	0,89	1,55
Rs Glucosa- Sacarosa	5,53	2,69	1,71	3,07

	Condición 17	Condición 18	Condición 19
<b>Parámetros</b>			
Columna	NH2P-40 3E Shodex	NH2P-40 3E Shodex	NH2P-40 3E Shodex
Pre-columna	Sin pre-columna	Sin pre-columna	Hojas con NH2P-50G 3A y Raíces son pre-columna
Fase móvil	Acetonitrilo 75%	Acetonitrilo 83%	Acetonitrilo 83%
Flujo	0,25 ml/min	0,25 ml/min	Hojas 0,35 ml/min y raíces 0,25 ml/min
Temperatura horno y DIR	45°C	45°C	45°C
Volumen de inyección	10 µl	10 µl	10 µl
Tiempo de corrida	30 min.	45 min	Hojas 25 min y Raíces 45 min
<b>Resolución</b>			
Rs Fructosa-Sorbitol	1,34	0,86	Hoja = Cond. 16 y Raíz = Cond. 18
Rs Sorbitol-Glucosa	3,18	1,19	Hoja = Cond. 16 y Raíz = Cond. 18
Rs Glucosa- Sacarosa	6,39	1,97	Hoja = Cond. 16 y Raíz = Cond. 18

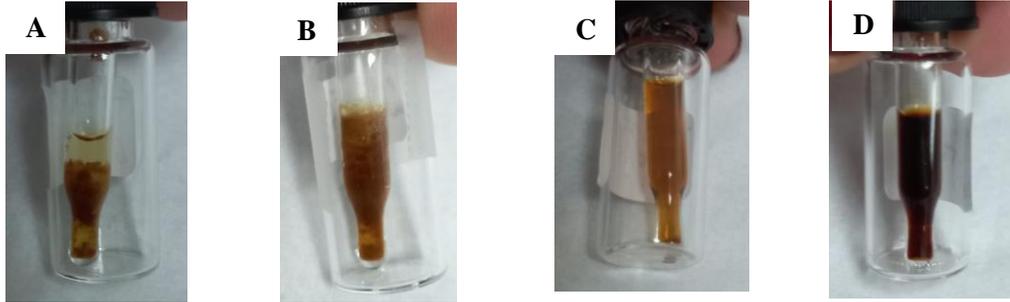


**Figura 18. Curvas de calibración.** Se grafican las curvas de calibración utilizadas en este trabajo, para fructosa (A), glucosa (B), sorbitol (C) y sacarosa (D), con sus respectivas ecuaciones de la recta, coeficiente de correlación ( $R^2$ ), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ).

## Anexo 2. Extracción de azúcares

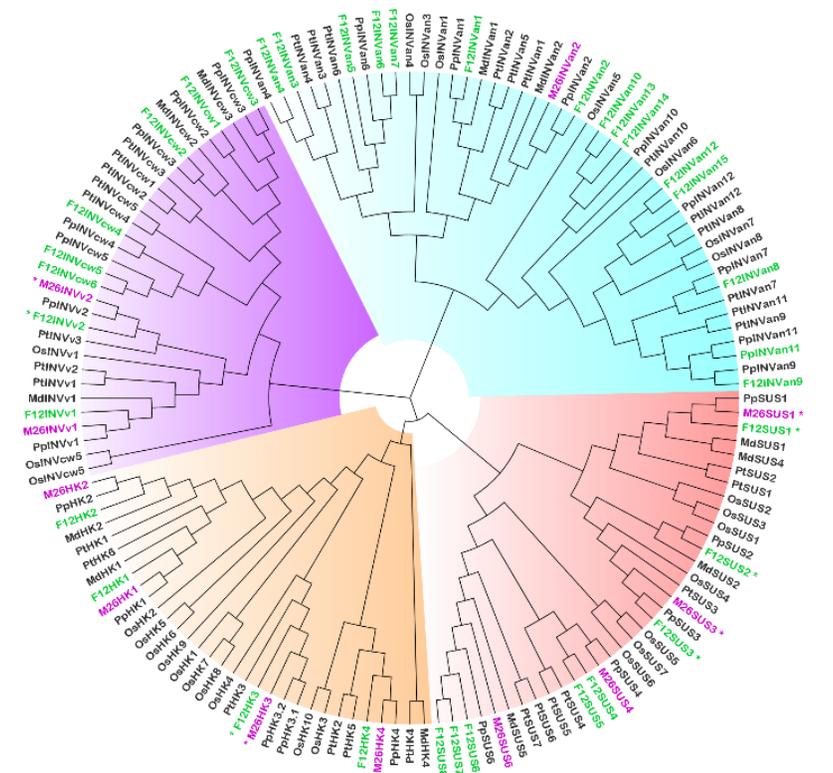


**Figura 19. Estado de muestras en cada paso del proceso de extracción.** (A) muestras de raíz (café-izquierda) y hoja (verde-derecha) luego de agregar metanol y centrifugar por primera vez. (B) muestras de raíz (café-izquierda) y hoja (verde-derecha) luego de agregar metanol 50% por primera vez y centrifugar. (C) Sobrenadantes de hoja (verde-izquierda) y raíz (amarillo-derecha) totales luego de filtrar (D) muestras de raíz (café-izquierda) y hoja (amarillo-derecha) luego de concentrar y diluir en acetonitrilo 50%.



**Figura 20. Muestras deterioradas.** Fotografías tomadas luego de 30 días realizada la extracción, las muestras fueron almacenada a 4°C. Sospecha de deterioro de muestras por microorganismo (A-C) ya que se forman precipitados y/o turbidez. Sospecha de oxidación de fenoles (D).

### Anexo 3. Identificación de SUS, INV y HK en M26 y F12



**Figura 21. Cladograma para Sacaras sintasas, Invertasas y Hexoquinasas encontradas en Mazzard F12/1 y Mariana 2624.** Sacaras sintasas (SUS): rojo; Hexoquinasas (HK):naranja; Invertasas alcalinas neutras (INVn): celeste; Invertasas de vacuolas (INVv) y de pared celular (INVc): morado. La nomenclatura indica con las primeras dos letras el organismo vegetal al que corresponde la secuencia (Pt: *Populus trichocarpa* [59, 53, 66]; Os: *Orizay sativa* [49, 60, 61]; Md: *Malus domestica* [63, 54] Pp: *Prunus persica* ; F12: Mazzard F12/1 – *Prunus avium* (verde);

M26: Mariana 2624 – *Prunus cerasifera* x *Prunus munsoniana* (rosado)), luego se menciona la enzima y la numeración asignada por los autores de las referencias. Se destacan las secuencias peptídicas que fueron analizadas mediante expresión génica con un asterisco (\*). Este cladograma se infirió, tras alineamientos múltiples con el algoritmo MUSCLE [86] y luego utilizando el método Neighbor-Joining [87]. Se muestra el árbol óptimo obtenido con el test bootstrap, luego de 2000 iteraciones. Este análisis involucró 129 secuencias de aminoácidos. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 1591 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X versión 10.2.6 [88]. La estética fue modifica con el software FigTree v1.4.4.

**Tabla 11. Nomenclatura y secuencias peptídicas encontradas en los portainjertos Mariana 2624 y Mazzard F12/1.**

Enzima	Mariana 2624 (M26) <sup>a</sup>		Mazzard F12/1 (F12) <sup>b</sup>			
	Nomenclatura	Hómologo <i>Prunus persica</i>	Nomenclatura	Código NCBI	Hómologo <i>Prunus persica</i>	Descripción NCBI
Hexoquinasa	M26HK1	Prupe.7G218800.1	F12HK1	XP_021807184.1	Prupe.7G218800.1	hexokinase-1-like
	M26HK2	Prupe.3G057800.1	F12HK2	XP_021800069.1	Prupe.3G057800.1	hexokinase-1-like
	M26HK3*	Prupe.1G366000.1	F12HK3*	XP_021826638.1	Prupe.1G366000.1	hexokinase-2, chloroplastic
	M26HK4	Prupe.4G256200.1	F12HK4	XP_021810618.1	Prupe.4G256200.1	hexokinase-3-like
Sacarosa sintasa	M26SUS1*	Prupe.7G192300.1	F12SUS1*	XP_021804853.1	Prupe.7G192300.1	sucrose synthase
			F12SUS2	XP_021806181.1	Prupe.1G131700.1	sucrose synthase 2-like
	M26SUS3*	Prupe.8G264300.1	F12SUS3*	XP_021805115.1	Prupe.8G264300.1	sucrose synthase 3
	M26SUS4*	Prupe.5G241700.1	F12SUS4*	XP_021801736.1	Prupe.5G241700.1	sucrose synthase 6-like isoform X1
			F12SUS5	XP_021801743.1	Prupe.5G241700.1	sucrose synthase 6-like isoform X2
	M26SUS6	Prupe.3G014100.1	F12SUS6	XP_021823837.1	Prupe.3G014100.1	sucrose synthase 7-like isoform X1
			F12SUS7	XP_021823835.1	Prupe.3G014100.1	sucrose synthase 7-like isoform X2
			F12SUS8	XP_021823836.1	Prupe.3G014100.1	sucrose synthase 7-like isoform X3
Invertasas alcalina / neutra			F12INVan1	XP_021825005.1	Prupe.6G309800.1	alkaline/neutral invertase A, mitochondrial-like
	M26INVAN2	Prupe.1G111800.1	F12INVan2	XP_021808489.1	Prupe.1G111800.1	alkaline/neutral invertase A, mitochondrial
			F12INVan3	XP_021823735.1	Prupe.2G083900.1	alkaline/neutral invertase E, chloroplastic-like isoform X1
			F12INVan4	XP_021823736.1	Prupe.2G083900.1	alkaline/neutral invertase E, chloroplastic-like isoform X2
			F12INVan5	XP_021802061.1	Prupe.6G122600.1	alkaline/neutral invertase E, chloroplastic-like isoform X2
			F12INVan6	XP_021802059.1	Prupe.6G122600.1	alkaline/neutral invertase E, chloroplastic-like isoform X1
			F12INVan7	XP_021802060.1	Prupe.6G122600.1	alkaline/neutral invertase E, chloroplastic-like isoform X1
			F12INVan8	XP_021826642.1	Prupe.1G365400.1	probable alkaline/neutral invertase B
			F12INVan9	XP_021814499.1	Prupe.2G075000.1	probable alkaline/neutral invertase B
			F12INVan10	XP_021815053.1	Prupe.1G058000.1	probable alkaline/neutral invertase F isoform X1
			F12INVan11	XP_021832905.1	Prupe.2G075000.1	probable alkaline/neutral invertase B
			F12INVan12	XP_021826165.1	Prupe.1G556900.1	probable alkaline/neutral invertase D
			F12INVan13	XP_021815054.1	Prupe.2G191400.1	probable alkaline/neutral invertase F isoform X1
			F12INVan14	XP_021815055.1	Prupe.2G191400.1	probable alkaline/neutral invertase F isoform X2
			F12INVan15	XP_021826166.1	Prupe.1G556900.1	probable alkaline/neutral invertase D
INV de vacuola	M26INVv1	Prupe.5G075600.1	F12INVv1	XP_021810312.1	Prupe.5G075600.1	acid beta-fructofuranosidase 2, vacuolar-like
	M26INVv2*	Prupe.2G277900.1	F12INVv2*	XP_021823469.1	Prupe.2G277900.1	acid beta-fructofuranosidase 1, vacuolar-like
Invertasa de pared celular			F12INVcw1	XP_021819145.1	Prupe.7G103100.1	beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme 3
			F12INVcw2	XP_021819120.1	Prupe.7G103100.1	beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme 1-like
			F12INVcw3	XP_021819659.1	Prupe.7G103100.1	beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme 1-like
			F12INVcw4	XP_021817169.1	Prupe.3G048300.1	beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme CWINV1-like
			F12INVcw5	XP_021812647.1	Prupe.3G009500.1	beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme CWINV1-like isoform X1
			F12INVcw6	XP_021812648.1	Prupe.3G009500.1	beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme CWINV1-like isoform X2

a: secuencias obtenidas de la base de datos aún no publicada de CEAF para Mariana 2624. b: secuencias obtenidas desde la base de datos del NCBI. Los \* indican las secuencias de interés para este trabajo.

## Anexo 4. Características de enzimas SUS, INV y HK *in silico*

Tabla 12.. Características y propiedades de isoformas de sacarosa sintasa en *P. avium* (Mazzard F12/1).

Nombre en este trabajo	Código Proteína NCBI	Homólogo en <i>P. persica</i>	Nombre de la proteína en inglés	Péptido (aa)	Peso Molecular (KDa)	pI	Índice de Estabilidad	Índice alifático	GRAVY	Ubicación Subcelular	TMH
F12SUS1	XP_021804853	Prupe.7G192300.1	sucrose synthase	750	85.86	5.97	32.15	92.91	-0.292	Mitocondria	No
F12SUS2	XP_021806181	Prupe.1G131700.1	sucrose synthase 2-like	835	94.75	5.68	41.73	93.860	-0.215	Cloroplasto	No
F12SUS3	XP_021805115	Prupe.8G264300.1	sucrose synthase 3	810	92.43	5.89	41.33	90.260	-0.288	Mitocondria	No
F12SUS4	XP_021801736	Prupe.5G241700.1	sucrose synthase 6-like isoform X1	903	102.20	7.52	40.36	84.190	-0.273	Cloroplasto	872-894
F12SUS5	XP_021801743	Prupe.5G241700.1	sucrose synthase 6-like isoform X2	898	101.56	7.23	40.78	84.650	-0.266	Cloroplasto	867-889
F12SUS6	XP_021823837	Prupe.3G014100.1	sucrose synthase 7-like isoform X3	826	94.15	7.20	39.07	85.840	-0.361	Cloroplasto	No
F12SUS7	XP_021823835	Prupe.3G014100.1	sucrose synthase 7-like isoform X1	842	95.74	7.20	40.06	85.610	-0.355	Citosol	No
F12SUS8	XP_021823836	Prupe.3G014100.1	sucrose synthase 7-like isoform X2	838	95.33	7.20	40.30	85.890	-0.364	Citosol	No

La nomenclatura utilizada en este trabajo F12: Mazzard F12/1 – *P. avium*, SUS: sacarosa sintasa, L: probable -del inglés “ like” , los números se asignados según la descripción de la proteína entregada por el NCBI, añadiendo el número de la isoforma, luego del punto. pI: punto isoelectrico; GRAVY: media general de hidropatía; TMH: hélice transmembrana.

Tabla 13. . Características y propiedades de isoformas de sacarosa sintasas en híbrido *P. cerasifera* x *P. munsoniana* (Mariana 2624).

Nombre en este trabajo	Homólogo en <i>P. persica</i>	Péptido (aa)	Peso Molecular (KDa)	pI	Índice de Inestabilidad	Estabilidad	Índice alifático	GRAVY	Ubicación Subcelular	TMH
M26SUS1	Prupe.7G192300.1	806	92.68	6.00	31.88	Estable	92.74	-0.308	Mitocondria	No
M26SUS3	Prupe.8G264300.1	810	92.34	5.92	38.62	Estable	90.01	-0.290	Mitocondria	No
M26SUS4	Prupe.5G241700.1	897	101.17	6.66	40.03	Inestable	85.83	-0.261	Cloroplasto	868-890
M26SUS6	Prupe.3G014100.1	842	95.73	6.69	39.83	Estable	85.49	-0.355	Citosol	No

La nomenclatura utilizada en este trabajo M26: Mariana 2624 – híbrido *P. cerasifera* x *P. munsoniana*, SUS: sacarosa sintasa, los números se asignados según la descripción de la proteína entregada por el Phytozome para su homólogo en *P. persica*. pI: punto isoelectrico; GRAVY: media general de hidropatía; TMH: hélice transmembrana.

**Tabla 14.. Características y propiedades de isoformas de invertasas en *P. avium* (Mazzard F12/1).**

Nombre en este trabajo	Código Proteína NCBI	Homologo en <i>P. persica</i>	Nombre de la proteína en inglés	Péptido (aa)	Peso Molecular (KDa)	pI	Índice de Estabilidad	Estabilidad	Índice alifático	GRAVY	Ubicación Subcelular	TMH
F12INVan1	XP_021825005.1	Prupe.6G309800.1	alkaline/neutral invertase A, mitochondrial-like	678	76.77	6.32	40.35	Instable	86.86	-0.256	Cloroplasto	No
F12INVan2	XP_021808489.1	Prupe.1G111800.1	alkaline/neutral invertase A, mitochondrial	680	76.66	6.46	41.23	Instable	88.57	-0.249	Cloroplasto	No
F12INVan3	XP_021823735.1	Prupe.2G083900.1	alkaline/neutral invertase E, chloroplastic-like isoform X1	651	73.49	6.08	46.27	Instable	84.95	-0.242	Citosol	No
F12INVan4	XP_021823736.1	Prupe.2G083900.1	alkaline/neutral invertase E, chloroplastic-like isoform X2	595	66.72	7.81	48.93	Instable	79.16	-0.300	Citosol	No
F12INVan5	XP_021802061.1	Prupe.6G122600.1	alkaline/neutral invertase E, chloroplastic-like isoform X2	620	69.56	6.30	41.05	Instable	86.58	-0.231	Citosol	No
F12INVan6	XP_021802059.1	Prupe.6G122600.1	alkaline/neutral invertase E, chloroplastic-like isoform X1	651	72.88	7.17	41.18	Instable	86.64	-0.239	Cloroplasto	No
F12INVan7	XP_021802060.1	Prupe.6G122600.1	alkaline/neutral invertase E, chloroplastic-like isoform X1	651	72.88	7.17	41.18	Instable	86.64	-0.239	Cloroplasto	No
F12INVan8	XP_021826642.1	Prupe.1G365400.1	probable alkaline/neutral invertase B	552	62.94	6.11	38.07	Instable	83.01	-0.220	Cloroplasto	No
F12INVan9	XP_021814499.1	Prupe.2G075000.1	probable alkaline/neutral invertase B	571	65.43	6.35	61.43	Instable	85.08	-0.216	Citosol	No
F12INVan10	XP_021815053.1	Prupe.1G058000.1	probable alkaline/neutral invertase F, isoform X1	684	76.81	5.86	50.74	Instable	81.87	-0.378	Cloroplasto	No
F12INVan11	XP_021832905.1	Prupe.2G075000.1	probable alkaline/neutral invertase B	573	65.84	6.90	59.95	Instable	82.57	-0.246	Citosol	No
F12INVan12	XP_021826165.1	Prupe.1G556900.1	probable alkaline/neutral invertase D	557	63.42	5.91	52.76	Instable	85.67	-0.194	Citosol	No
F12INVan13	XP_021815054.1	Prupe.2G191400.1	probable alkaline/neutral invertase F, isoform X1	684	76.81	5.86	50.74	Instable	81.87	-0.378	Cloroplasto	No
F12INVan14	XP_021815055.1	Prupe.2G191400.1	probable alkaline/neutral invertase F, isoform X2	607	67.88	5.12	51.09	Instable	79.54	-0.348	Cloroplasto	No
F12INVan15	XP_021826166.1	Prupe.1G556900.1	probable alkaline/neutral invertase D	557	63.42	5.91	52.76	Instable	85.67	-0.194	Citosol	No
F12INVan16	XP_021819145.1	Prupe.7G103100.1	beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme 3	587	66.44	7.70	33.15	Estable	76.41	-0.405	Cloroplasto	No
F12INVan17	XP_021819120.1	Prupe.7G103100.1	beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme 1-like	578	64.91	7.01	30.85	Estable	81.96	-0.246	Vacuola	No
F12INVan18	XP_021819659.1	Prupe.7G103100.1	beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme 1-like	587	66.24	7.05	32.68	Estable	78.88	-0.345	Vacuola	No
F12INVan19	XP_021817169.1	Prupe.3G048300.1	beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme CWINV1-like	575	64.49	9.02	30.13	Estable	83.76	-0.362	Cloroplasto	No
F12INVan20	XP_0218172647.1	Prupe.3G009500.1	beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme CWINV1-like isoform X1	577	64.67	8.64	33.16	Estable	83.12	-0.382	Cloroplasto	No
F12INVan21	XP_0218172648.1	Prupe.3G009500.1	beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme CWINV1-like isoform X2	551	62.01	8.56	34.33	Estable	82.78	-0.387	Cloroplasto	No
F12INVan22	XP_021810312.1	Prupe.5G075600.1	acid beta-fructofuranosidase 2, vacuolar-like	685	76.45	6.55	31.18	Estable	82.09	-0.258	Membrana Plasmatica	1-660
F12INVan23	XP_021823469.1	Prupe.2G277900.1	acid beta-fructofuranosidase 1, vacuolar-like	637	70.18	4.68	30.32	Estable	83.41	-0.169	Citosol	50-637

Los nombres utilizados en el presente trabajo indican con las primeras letras la especie (*Pa: Prunus avium* – *F12*), las tres siguientes en mayúscula el nombre de la proteína (INV: invertasa) y las últimas una característica de la proteína (AN: alcalina/neutral; CW: pared celular; M: mitocondria; P: plastidio; V: vacuolar), mientras que los números son asignados al azar dentro de cada grupo. Siglas: pl: punto isoelectrico; GRAVY: media general de hidropatía; TMH: hélice transmembrana.

**Tabla 15. Características y propiedades de isoformas de invertasas en híbrido *P. cerasifera* x *P. munsoniana* (Mariana 2624).**

Nombre en este trabajo	Homologo en <i>P. persica</i>	Péptido (aa)	Peso Molecular (KDa)	pI	Índice de Inestabilidad	Estabilidad	Índice alifático	GRAVY	Ubicación Subcelular	TMH
M26INVan2	Prupe.1G111800.1	680	76.54	6.49	40.08	Instable	87.87	-0.265	Cloroplasto	No
M26INVv1	Prupe.5G075600.1	686	76.57	6.34	31.59	Estable	81.55	-0.273	Plastidio	663-685
M26INVv2	Prupe.2G277900.1	637	70.51	4.68	31.27	Estable	82.94	-0.189	Citosol	30-49

Los nombres utilizados en el presente trabajo indica con las primeras letras y números el portainjerto (M26: Mariana 2624 – híbrido *P. cerasifera* x *P. munsoniana*), las tres siguientes en mayúscula el nombre de la proteína (INV: invertasa) y las últimas una característica de la proteína (AN: alcalina/neutral; CW: pared celular; M: mitocondria; P: plastidio; V: vacuolar), mientras que los números son asignados al azar dentro de cada grupo. Siglas: pl: punto isoelectrico; GRAVY: media general de hidropatía; TMH: hélice transmembrana.





**Tabla 16. Características y propiedades de isoformas de hexoquinasas en *P. avium* (Mazzard F12/1).**

Nombre en este trabajo	Código Proteína NCBI	Homólogo en <i>P. persica</i>	Nombre de la proteína en inglés	Péptido (aa)	Peso Molecular (KDa)	pI	Índice de Estabilidad	Estabilidad	Índice alifático	GRAVY	Ubicación Subcelular	TMH
F12HK1	XP_021807184.1	Prupe.7G218800	hexokinase-1-like	498	53.93	5.79	33.28	Estable	93.03	-0.024	Cloroplasto	5 - 24
F12HK2	XP_021800069.1	Prupe.3G057800	hexokinase-1-like	497	53.55	6.30	29.32	Estable	99.280	0.015	Cloroplasto	5 - 23
F12HK3	XP_021826638.1	Prupe.1G366000	hexokinase-2, chloroplastic	494	53.25	5.19	44.26	Inestable	92.000	0.002	Cloroplasto	No
F12HK4	XP_021810618.1	Prupe.4G256200	hexokinase-3-like	508	55.50	6.78	47.77	Inestable	97.64	-0.029	Cloroplasto	4 - 26

Los nombres utilizados en el presente trabajo indican con las primeras letras la especie (Pa: *Prunus avium* – F12), las tres siguientes en mayúscula el nombre de la proteína (INV: invertasa) y las últimas una característica de la proteína (AN: alcalina/neutra; CW: pared celular; M: mitocondria; P: plastidio; V: vacuolar), mientras que los números son asignados al azar dentro de cada grupo. Siglas: pI: punto isoeléctrico; GRAVY: media general de hidropatía; TMH: hélice transmembrana.

**Tabla 17. Características y propiedades de isoformas de hexoquinasas en híbrido *P. cerasifera* x *P. munsoniana* (Mariana 2624).**

Nombre en este trabajo	Homólogo en <i>P. persica</i>	Péptido (aa)	Peso Molecular (KDa)	pI	Índice de Inestabilidad	Estabilidad	Índice alifático	GRAVY	Ubicación Subcelular	TMH
M26HK1	Prupe.7G218800	498	53.92	5.79	32.90	Estable	93.41	-0.018	Cloroplasto	5 - 24
M26HK2	Prupe.3G057800	497	53.46	6.17	28.17	Estable	100.26	0.034	Cloroplasto	5 - 23
M26HK3	Prupe.1G366000	494	53.16	5.35	46.62	Inestable	92.41	0.018	Cloroplasto o Mitocondria	No
M26HK4	Prupe.4G256200	508	55.52	6.36	48.39	Inestable	98.23	-0.016	Cloroplasto	4 - 26

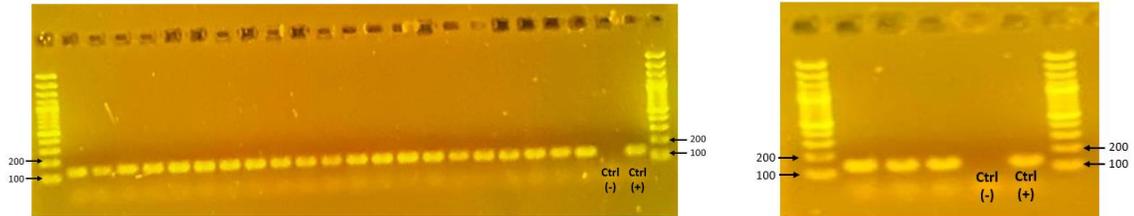
Los nombres utilizados en el presente trabajo indican con las primeras letras la especie (Pa: *Prunus avium* – F12), las tres siguientes en mayúscula el nombre de la proteína (INV: invertasa) y las últimas una característica de la proteína (AN: alcalina/neutra; CW: pared celular; M: mitocondria; P: plastidio; V: vacuolar), mientras que los números son asignados al azar dentro de cada grupo. Siglas: pI: punto isoeléctrico; GRAVY: media general de hidropatía; TMH: hélice transmembrana.

## Anexo 5. Totalidad de partidores diseñados y sintetizados.

Enzima	Gen homólogo <i>P. persica</i>	Secuencia partidior 5'→3'	Información IDT			Información <i>in silico</i>			Información experimental			
			Peso molecular (g/mol)	T° melting (°C)	Largo partidior	%GC	T° melting (°C)	Largo amplicón	T° annealing (°C)	Eficiencia	% Eficiencia	
Hexokinasa	PRUPE.1G366000	F1- AAACCCCTCAGCTTTGTACCCAA	6623.4	56.8	22	45.5	56.8	128.0	56.0	1.988	99.4	
		R1- TGGTTTTGGGTAGCTGACATGA	6836.5	56.5	22	45.5	56.5					
		F2- TCATGTCAGCTACCCAAAACCA	6632.4	56.5	22	45.5	56.5	198.0	56.0			
		R2- GGAAAATAGTGAACAAGGCACA	6850.5	56.0	22	45.5	56.0					
Sacarosa Sintasa	PRUPE.7G192300.1	F1- TCATCACCACAAGCACCT	5975.0	56.8	20	50.0	56.8	70.0	56.0			
		R1- GGTCAGGGAAGTGCAGAGA	6280.1	56.8	20	55.0	56.8					
		F2- CTAGAAGTGGCCAAAAGTCCG	6464.3	55.8	21	52.4	55.8					
	PRUPE.7G192300	R2- AAGTGCAGAGAAAGAGGGGC	6289.1	57.4	20	55.0	57.4	91.0	56.0	1.952	97.6	
		F1- TGGTTGGCTAAGAGTGGAGTTT	6876.5	56.3	22	45.5	56.3					
		R1- GCAGAACCAAGACTAGTGAAGC	6826.5	55.7	22	50.0	55.7					
	PRUPE.1G131700.1	F2- GCATTGGTTGGCTAAGAGTGGA	6870.5	57.5	22	50.0	57.5	191.0	56.0			
		R2- TGGATAGCAGAACCAAGACTAGGTG	7474.9	56.0	24	45.8	56.0					
		F1- GTGGCCCTGCTGAGATCATT	6124.0	57.5	20	55.0	57.5					
	PRUPE.8G264300.1	R1- AGTCAACCAGAAAGTGCAGCC	6120.0	57.8	20	55.0	57.8	90.0	57.0			
		F2- CCCTGCTGAGATCATTGAGC	6093.0	55.7	20	55.0	55.7					
		R2- GCATCGTCAAAAGAAAGTCAACC	6737.4	56.4	22	50.0	56.4					
PRUPE.8G264300.1	F1- GATGAGTGATGCGTGGTATGA	6910.5	57.2	22	45.5	57.2	70.0	56.0	1.943	97.1		
	R1- CATACACACACAACAAGCG	6659.4	55.0	22	50.0	55.0						
	F2- CGCTTTGTTGTGTGTGTATG	6809.4	55.0	22	45.5	55.0						
Invertasa	PRUPE.5G075600.2	R2- GCAGGCATATCAATCCGTTAC	7269.8	56.0	24	45.5	56.0	86.0	56.0			
		F1- TGGAGGCCTAAATCTCTGTTC	6725.4	55.6	22	45.5	55.6					
		R1- GCATAGTCTCAGCCGTTGGG	6453.2	58.3	21	57.1	58.3					
	PRUPE.2G277900.1	F2- TTGGTGAGAATGGAGGCCTAAA	6863.5	56.1	22	45.5	56.1	118.0	56.0			
		R2- TTGGTGATTGATTGGCATAGTTC	7444.9	55.6	24	41.7	55.6					
		F1- ACAACCACCAATCTCCATGCTT	6583.3	57.1	22	45.5	57.1					
	PRUPE.2G277900.1	R2- GCAAGTGGGTTTGAGAGAGAA	6928.5	57.2	22	50.0	57.2	173.0	57.0	1.957	97.8	
		F2- ACCACCAATCTCCATGCTTATGT	6918.6	56.5	23	43.5	56.5					
		R2- TGGGGTTTGAGAGAGAAGAGTG	6959.6	56.2	22	50.0	56.2					
	Fosfoglucomutasa	PRUPE.2G286900.1	F1- TGCCAAAGTGTACCCCTAAGCT	6694.4	56.5	22	45.5	56.5	74.0	56.0		
			R1- CGCCGACAGACAAAATTGAA	6104.0	56.7	20	50.0	56.7				
			F2- GGTGATGCCCTTTCTCTCTCG	6370.2	56.1	21	52.4	56.1				
PRUPE.1G330700.1		R2- GAGACTGTGTTGCTCTGTGT	6474.2	55.1	21	47.6	55.1	93.0	56.0			
		F1- TCCGATCTCATATTCCTCCCC	6228.1	55.5	21	52.0	55.5					
		R1- TGCCGAAGAGAGAGTGAAGTGA	6624.4	56.6	21	52.0	56.6					
PRUPE.1G330700.1	F2- CGTTGCCACCTTTCAATTTCACT	6587.3	56.2	22	45.0	56.2	80.0	56.0	1.993	99.7		
	R2- AGGGAGAGATACAAGGCGAG	6289.1	55.8	20	55.0	55.8						
	F1- TTGACCTGCTCGCCATATC	6003.9	57.2	20	55.0	57.2						
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	PRUPE.1G541200.1	R2- GTCAGCAAGAATCATAATCGGG	6792.5	53.6	22	45.0	53.6	88.0	57.0			
		F2- TCACAACCTTGACCTGCTCGC	6012.9	57.9	20	55.0	57.9					
		R2- GCTTTGAGTAGTCTGGGATTCA	7085.6	56.5	23	48.0	56.5					
	PRUPE.6G210900.1	F1- CTCCTTCCCCGTTTCCCAT	5905.9	57.3	20	55.0	57.3	73.0	56.0			
		R1- TCAGAGATTGAGAGCTGGAGA	6559.3	54.7	21	47.6	54.7					
		F2- TCCTTCCCCGTTTCCCATAG	6259.1	56.7	21	52.4	56.7					
PRUPE.6G211000.1	R2- CAGAGATTGAGAGCTGGAGAAGA	7210.7	55.8	23	47.8	55.8	70.0	56.0	1.924	96.2		
	F1- GCAAAGACCACATCAGGCAG	6129.0	56.6	20	55.0	56.6						
	R1- GGGTTGTTCTGCTCTGAATGC	6763.4	56.8	22	50.0	56.8						
PRUPE.1G541200.7	F2- CCAAGCATGATCCATAACTTCGC	6952.6	56.4	23	47.8	56.4	81.0	56.0				
	R2- TCTTCAGGAGATTAGAGAGCT	6814.5	54.3	22	45.5	54.3						
	F1- CTCTTTGGCTGTTGTTGAGT	6769.4	55.4	22	45.0	55.4						
PRUPE.4G166400	R1- TGGTTGAAGTGGGAAGGAGG	6342.2	56.9	20	55.0	56.9	72.0	56.0	2.027	101.4		
	F2- TTGGTCGTGTTGAGTACC	6170.0	54.8	20	50.0	54.8						
	R2- AACTGGTTGAAGTGGGAAGG	6286.1	55.0	20	50.0	55.0						
PRUPE.4G166400	F1- CTGAAGCAAAGACTCCGCT	6071.0	57.5	20	55.0	57.5	125.0	57.0				
	R1- TCCTTTGAGATGTGTGGCCG	6155.0	57.6	20	55.0	57.6						
	F2- CTGAAGCAAAGACTCCGCT	6071.0	57.5	20	55.0	57.5						
		R2- CATGGAAGGTTGGATCACGGA	6535.3	57.1	21	52.0	57.1	97.0	57.0	1.984	99.2	

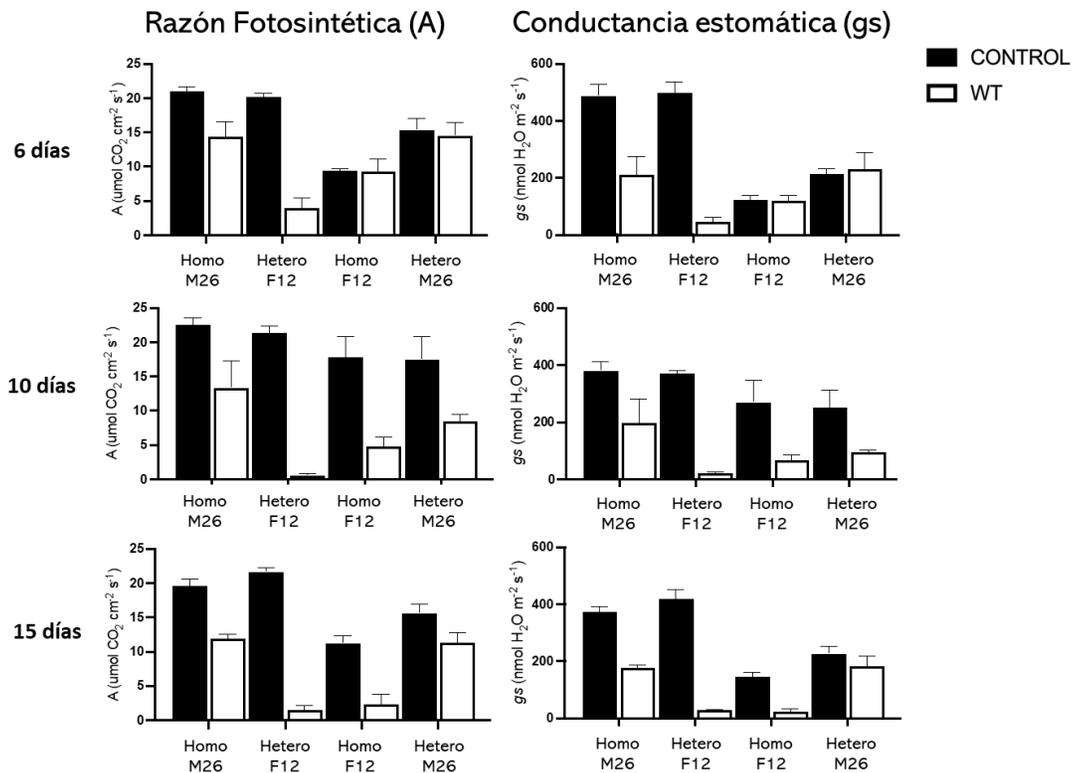
**Tabla 18. Partidores diseñados y sintetizados.** Se añade, junto a las secuencias de los partidores, la información entregada por la empresa IDT (Integrated DNA Technologies - <https://www.idtdna.com/>), donde estos se enviaron a sintetizar, la información obtenida *in silico* en Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>), OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) y Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), durante su diseño, y finalmente la información obtenida por análisis experimental mediante qPCR.

## Anexo 6. Síntesis de cDNA



**Figura 24. Geles de agarosa 1% posterior a síntesis de cDNA con gen de referencia.** Se muestran 2 geles realizados luego de sintetizar cDNA para muestras de 10 días de tratamiento en hipoxia. La primera y última columna de cada gel corresponde al *ladder DNA* 100 bp indicando en ellos a las filas correspondiente a 100 – 200 pb, rango donde se encuentra el amplicón. Ctrl (-) corresponde a la columna del control negativo y Ctrl (+) al control positivo.

## Anexo 7. Resultados preliminares tasa fotosintética



**Figura 25. Tasa fotosintética de combinaciones de homo y heteroinjertos entre Mariana 2624 (M26) y Mazzard F12/1 (F12).** Se grafican dos parámetros que indican la tasa fotosintética. Estos son resultados preliminares del Laboratorio de Fisiología del Estrés, CEAF. Autoría de Dra. Paula Pimentel.