



CARRERA INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO.



# UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Universidad Andrés Bello  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

## ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE GENES CLAVES DE LA BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS EN EL DESARROLLO DE DESÓRDENES FISIOLÓGICOS EN PALTA cv. HASS

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de  
**Magíster en Biotecnología.**

**Director de Tesis:** Dr. Mauricio González Agüero.  
**Profesor Patrocinante:** Dr. Juan Antonio Valdés.  
**Facultad:** Facultad de Ciencias Biológicas.  
**Universidad:** Universidad Andrés Bello.

**Miguel Ángel García Rojas**

**Santiago de Chile  
Diciembre, 2010**



# **UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO**

Facultad de Ciencias Biológicas  
Ingeniería en Biotecnología

## **ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE GENES CLAVES DE LA BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS EN EL DESARROLLO DE DESÓRDENES FISIOLÓGICOS EN PALTA cv. HASS**

**MIGUEL ANGEL GARCÍA ROJAS**

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del director de Tesis Dr. Mauricio González-Agüero, en el Laboratorio de Postcosecha del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), aprobado por los miembros de la Comisión de evaluación.

---

Dr. Mauricio González-Agüero.  
Director de Tesis

---

Dr. Reinaldo Campos.  
Comisión de Tesis

---

Dr. Bruno Defilippi.  
Comisión de Tesis

---

Dr. Juan Antonio Valdés  
Comisión de Tesis

SANTIAGO-CHILE  
Año 2010

**A mis padres, hermanos,  
Daniela y Bastián.**

## **Agradecimientos**

Agradezco al instituto de investigación agropecuaria por facilitar sus dependencias para la realización de mi tesis.

Primero que todo quiero agradecer a mis padres por darme la posibilidad de estudiar y confiar en mí, sobre las decisiones que tomé dentro del transcurso de mi educación. A mis hermanos los cuales nunca entendieron que estudie, pero que me escucharon cuando los necesite.

Quiero agradecer en especial a Daniela Torres, la cual estuvo conmigo todo el tiempo, fue la que tuvo que soportar los enojos, falta de tiempo, alegrías y tristezas todo el período que estuve estudiando y fue la que me dio lo más importante de mi vida, mi hijo, Bastián.

La elaboración de esta tesis fue lograda gracias al apoyo de los profesores: Daniel Manríquez, Bruno Defilippi, Reinaldo Campos, Carmen Gloria Feijóo, Juan Antonio Valdés y en especial al Dr. Mauricio González-Agüero, el cual confió en mí y estuvo siempre apoyándome. Todos ellos tuvieron mucha paciencia y disposición en enseñarme cuando se les solicito, y fueron un pilar para la elaboración de esta tesis.

No pueden quedar exentos mis amigos y colegas los cuales aportaron su granito de arena, algunos en la formación de la tesis y otros alentándome en la elaboración de esta. Por lo tanto agradezco a: Manuel, Álvaro, Orianne, Cinthya, Manuel G, Luana y Héctor.

## **Financiamiento**

El trabajo de titulación fue financiado por el proyecto Fondecyt 11080236

## Índice

Resumen .....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Revisión bibliográfica.....	4
1. Características fisiológicas de <i>Persea americana</i> Mill.....	4
2. Rol del etileno en la coordinación del proceso de maduración en frutos climatéricos. ....	5
3. Uso de inhibidores de etileno en frutas para prolongar la vida de postcosecha. ....	6
4. Daño por frío ( <i>Chilling Injury</i> ) en frutos. ....	7
5. Desórdenes fisiológicos en <i>Persea americana</i> Mill. ....	8
6. El efecto de la época de cosecha del fruto <i>Persea americana</i> Mill en el desarrollo de desórdenes fisiológicos.....	11
7. Contenido de aceite e índice de maduración en <i>Persea americana</i> .....	11
8. Biosíntesis de lípidos en plantas. ....	12
8.1. Enzimas claves en la biosíntesis de lípidos.....	12
8.2. Rol de los lípidos en la aclimatación a bajas temperaturas. ....	14
Hipótesis .....	15
Objetivo General.....	15
Objetivos Específicos .....	15
Materiales y Métodos .....	16
1. Obtención del transcrito de largo completo.....	16
2. Clonación y transformación.....	16
3. Análisis Bioinformáticos .....	17
4. Cosecha y manejo de la fruta.....	18
5. Medición del contenido de aceite. ....	18
6. Tratamientos .....	19
7. Almacenamiento y evaluaciones. ....	19

8.	Extracción, cuantificación y verificación de la integridad de RNA. ....	20
9.	Síntesis y verificación de cDNA. ....	20
10.	Amplificación por PCR a partir de cDNAs. ....	21
11.	Análisis de expresión en PCR cuantitativo en tiempo real (q-PCR). ....	21
12.	Análisis estadístico .....	22
	Resultados.....	23
1.	Caracterización del estado de madurez de los frutos.....	23
1.1.	Firmeza de pulpa. ....	23
1.2.	Color de piel. ....	25
1.3.	Análisis del contenido de aceite en frutos de <i>Persea americana</i> .....	26
1.4.	Determinación de desórdenes fisiológicos.....	27
2.	Identificación y Caracterización molecular de <i>Acetil CoA Carboxilasa</i> subunidad <i>biotina carboxilasa</i> (BC) de <i>Persea americana</i> . ....	30
2.1.	Obtención del transcrito de largo completo de la subunidad <i>biotina carboxilasa</i> de la enzima <i>Acetil-CoA Caboxilasa (PamACCase BC)</i> .....	30
2.2.	Análisis de secuencia nucleotídica y aminoacídica de <i>PamACCase BC</i> . ....	30
2.3.	Análisis de motivos y dominios estructurales de <i>PamACCase BC</i> .....	32
3.	Caracterización molecular de <i>Acetil CoA Carboxilasa</i> subunidad Proteína transportadora de <i>Carboxil Biotina (BCCP)</i> de <i>Persea americana</i> .....	34
3.1.	Obtención del transcrito de largo completo de la subunidad proteína transportadora de carboxil biotina de la enzima <i>Acetil CoA Carboxilasa (PamACCase BCCP)</i> .....	34
3.2.	Análisis de secuencia nucleotídica y aminoacídica de <i>PamACCase BCCP</i> . ....	34
3.3.	Análisis de motivos y dominios estructurales de <i>PamACCase BCCP</i> .....	35
4.	Caracterización de <i>PamACCase</i> y <i>SAD</i> en diferentes tejidos de <i>Persea americana</i> . ....	37
4.1.	Análisis de expresión mediante PCR de <i>ACCcase BC</i> , <i>BCCP</i> , <i>SAD</i> y <i>Rubisco</i> en diferentes tejidos de <i>Persea americana</i> .....	37

5. Estudio de expresión mediante Real-Time PCR (q-PCR) de <i>PamACCcase BC</i> , <i>PamACCcase BCCP</i> , <i>PamSAD</i> y <i>PamACO</i> .....	38
5.1. Generación de cDNA para q-PCR .....	38
5.2. Primer utilizados para los análisis de expresión mediante q-PCR.....	39
5.3. Identificación de un gen de expresión constitutiva ( <i>HouseKeeping</i> ) para <i>Persea americana</i> .....	40
5.4. Estudio de expresión de <i>PamACCcase BC</i> , <i>Pam ACCcase BCCP</i> y <i>PamSad</i> en frutos a cosecha. ....	42
5.5. Análisis de expresión de <i>PamACCcase BC</i> , <i>PamACCcase BCCP</i> y <i>PamSAD</i> en frutos que presentaron pardeamiento interno .....	43
5.6. Análisis de expresión de <i>PamACCcase BC</i> , <i>PamACCcase BCCP</i> y <i>PamSAD</i> en frutos sin desórdenes internos. ....	45
5.7. Estudio de expresión de <i>Aminociclopropanocarboxilato oxidasa (PamACO)</i> en frutos tratados con el inhibidor de la percepción de etileno (1-MCP). ....	47
5.8. Estudio de expresión de <i>PamSAD</i> , <i>PamACCcase BC</i> y <i>PamACCcase BCCP</i> en frutos tratados con el inhibidor de la percepción de etileno (1-MCP). ....	48
Discusión .....	49
1. Caracterización del estado de madurez. ....	49
1.1. Caracterización molecular de <i>PamACCcase BC</i> .y <i>PamACCcase BCCP</i> .....	51
1.2. Análisis de expresión mediante q-PCR en frutos con desórdenes fisiológicos. ....	53
1.3. Efecto de etileno en la expresión de los genes <i>PamACCcase BC</i> , <i>Pam ACCcase</i> <i>BCCP</i> y <i>PamSAD</i> .....	55
Conclusión .....	57
Bibliografía.....	58



## Resumen

El almacenamiento refrigerado es ampliamente utilizado para extender la vida de frutas y hortalizas después de la cosecha. La reducción de la temperatura disminuye el metabolismo celular y retrasa la senescencia y maduración de los frutos. Los frutos subtropicales, como la palta (*Persea americana*), son menos tolerantes a las bajas temperatura que los frutos templados, lo que resulta en el desarrollo de desórdenes fisiológicos. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar el mecanismo que conduce al desarrollo de pardeamiento interno (PI) en palta Hass. PI fue estudiado teniendo en cuenta la época de cosecha (cosecha temprana v/s tardía), temperatura de almacenamiento (5 ° C v/s 0 ° C), y la inhibición del etileno (1-metilciclopropeno). En general se observó una mayor incidencia de PI en frutos cosechados tardíamente los cuales fueron almacenados a 0 ° C. De este estudio se relacionó la generación de PI a dos pasos enzimáticos relacionados con el metabolismo de lípidos, es decir, las enzimas acetil CoA carboxilasa (ACCase) y esteroil ACP desaturasa. Respecto a ACCase, dos subunidades se identificaron y caracterizaron: i) biotina carboxilasa (BC) y ii) proteína transportadora de carboxil biotina (BCCP). Los transcritos de largo completos de las dos subunidades mostraron dominios altamente conservados entre secuencias pertenecientes a otras especies de plantas. Ambos genes mostraron un patrón de expresión relacionadas con el desarrollo del PI, donde *PamACCase BC* y *PamACCase BCCP* tuvieron una disminución en frutas que desarrollaron PI, correspondiente a paltas de una cosecha tardía almacenadas a 0 ° C. La expresión de *PamSAD* tuvo una respuesta diferente a los genes ya mencionados la cual estuvo suprimida en frutos con síntomas de PI. En relación con la inhibición de etileno, sólo *PamACCase BCCP* y *PamSAD* mostraron cambios en su expresión en fruta tratada con 1-metilciclopropeno, lo que indicaría que el etileno podría regular la expresión génica. Por lo tanto, los genes estudiados en este trabajo podrían ser parte de un importante mecanismo para explicar el desarrollo diferencial de PI en palta Hass.

**Palabras claves:** *ACCase BC*; *ACCase BCCP*; *SAD*; Pardeamiento Interno; 1-MCP.

## Abstract

Refrigerated storage is widely used to extend the life of fruit and vegetables after harvest. The reduction of temperature decreases the cellular metabolism and delay fruit senescence and ripening. Subtropical fruit such as avocado (*Persea americana*), are less tolerant to the reduction on temperature than temperate fruit, resulting in the development of physiological disorders. Therefore, the main objective of this work was to study the underlying mechanism leading to the development of internal browning (IB) in Hass avocado. IB was studied considering harvest time (early vs. late harvest), storage temperature (5°C vs. 0°C), and ethylene inhibition (1-methylcyclopropene). In general we observed a higher incidence of IB in late harvested fruit and in the one stored under 0°C. From this study we could relate the generation of IB to a two enzymatic steps related to lipid metabolism, i.e. the enzymes Acetyl CoA Carboxylase (ACCase) and Stearoyl ACP desaturase. Regarding ACCase, two subunits were identified and characterized: i) Biotin carboxylase (BC) and ii) Biotin carboxyl carrier protein(BCCP). Full length of the two subunits showed highly conserved domains among the sequences belonging to other plant species. Both genes showed an expression pattern related to the development of IB, where *PamACCase BC* and *PamACCase BCCP* had a decrease in fruit with IB development, corresponding to avocados from a late harvest or stored under 0°C. *PamSAD* expression had a different response to the genes already mentioned remaining suppressed in fruit with IB symptoms. Relative to ethylene inhibition, only *PamACCase BCCP* and *PamSAD* showed changes in their expression on fruit applied with 1-methylcyclopropene, which would indicate that ethylene could be regulating gene expression. Therefore, it seems that the genes studied in this work could be part of a major mechanism to explain the differential development of IB on Hass avocado.

**Key words:** *ACCase BC*; *ACCase BCCP*; *SAD*; Internal Browning; 1-MCP.

## Introducción

Chile es uno de los mayores exportadores de Palta (*Persea americana* Mill) en el mundo y ha tenido un aumento considerable de superficies plantadas en los últimos 8 años según fuente ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias), ver tabla 1. Respecto a los cultivares más plantados y exportados en el país, el cultivar Hass es el primero dejando en 2º lugar al cultivar Fuerte (Fuente ODEPA).

Año	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
<b>Superficie plantada</b>	23.260	23.800	24.000	26.731	26.744	26.759	33.837	33.531

**Tabla 1.** Superficie plantada de paltos en número de Hectáreas, según fuente ODEPA.

Con el crecimiento ascendente de las superficies plantadas, el mercado exportador ha tenido un crecimiento variable en los últimos 7 años, observando un crecimiento record de 185.000 toneladas exportadas en la temporada 2009/10, según fuente del comité de paltas. El principal mercado de destino para las paltas chilena es Estados Unidos, pero la aparición de nuevos mercados como el de Europa y Japón es un gran desafío para la industria, por lo distante a lo cual se encuentran, siendo un promedio de 35-45 días en tránsito. Por lo tanto, para poder extender la vida de postcosecha de los frutos es necesario envío de períodos de almacenamiento a bajas temperaturas más prolongado durante el tránsito, lo cual puede desencadenar la aparición de desórdenes fisiológicos, afectando gravemente la calidad de los frutos. Dentro de los parámetros que influyen en la calidad y aceptabilidad de la fruta se encuentra la presencia de defectos, tales como los desórdenes fisiológicos que se desarrollan durante el almacenaje a bajas temperatura de la fruta en postcosecha (Kader y Arpaia, 2002). Por otra parte, si la fruta es cosechada en un período de desarrollo en el cual se encuentra fisiológicamente inmadura, los resultados indicarían una maduración irregular, tanto de sabores como en la aparición de desórdenes fisiológicos (Lizana *et al*, 1992).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. Características fisiológicas de *Persea americana* Mill.

La palta es un fruto subtropical originario de América perteneciente a la familia de las Lauráceas, esta es cultivada en los 5 continentes y en más de 50 países (Zentemeyer, 1987; Knight, 2002). Es un fruto climatérico, lo que significa que tiene un aumento en la tasa de respiración al comienzo de la maduración seguido por una disminución de ésta. Se define a la maduración como un período durante el cual una serie de cambios bioquímicos se inician por la producción autocatalítica de etileno, lo cual marca un cambio de crecimiento a senescencia el que está estrechamente relacionado con un aumento en la respiración y ablandamiento de la pulpa (Zamorano *et al.*, 1994; Rhodes, 1981). Además, otros atributos fisiológicos y bioquímicos varían durante la maduración del fruto, que generalmente incluye cambios en el color, textura, sabor, aroma, contenido nutricional y susceptibilidad a patógenos oportunistas (Kesari *et al.*, 2007).

La palta tiene una de las tasas de maduración más alta comparada con otros frutos, llegando a madurar dentro de los 5 a 7 días después de la cosecha; por lo tanto, desde el punto de vista comercial es importante asegurar una buena calidad del fruto cuando llegue a destino. Respecto a esto, se recomienda almacenar la palta a bajas temperaturas para extender la vida después de la cosecha y reducir la deterioración del fruto (Paull, 1990). Para el cv. Hass se recomienda una temperatura de almacenamiento entre 5-7°C (Paull, 1990), donde la temperatura ideal depende del estado fisiológico del fruto y el tiempo de almacenamiento. Aunque el tiempo de almacenamiento puede ser extendido reduciendo la temperatura, se tiene que tomar en consideración que el daño por frío (*Chilling Injury*) es inducido por debajo de los 7°C y que es un factor que influye en la calidad de la palta (Zauberman *et al.*, 1977). Después del proceso de almacenamiento la palta puede presentar algunos desórdenes fisiológicos a causa del frío como: decoloración del sistema vascular, picaduras en la superficie y problemas en el ablandamiento (Paull, 1990). Específicamente desórdenes fisiológicos tales como senescencia de la pulpa, pardeamiento vascular y otros ocurren cuando la palta Hass es almacenada por más de 4-6 semanas en frío y posteriormente mantenida a temperatura ambiente (Woolf *et al.*, 2004). La temperatura crítica para el almacenamiento de paltas no maduras ha sido reportado ser 8°C (Lyons, 1973) y en el rango de 5-8°C para paltas var Hass (Snowdon, 1990; Dopico *et al.*, 1993).

Los frutos de palta presentan una curva de crecimiento del tipo simple sigmoidea, en un proceso continuo de división y elongación celular hasta la maduración completa (Lewis, 1978). El proceso de crecimiento de los frutos está sustentado principalmente por el aporte de fotosintatos (productos químicos resultantes de la fotosíntesis) provenientes de las hojas, ya que la capacidad fotosintética propia del fruto es muy baja, consistiendo éste básicamente en azúcares y derivados. Estas sustancias pueden tener distintas utilidades en los frutos, ya sea como productos de almacenaje y elementos estructurales, además de proveer de energía para la actividad celular (Bean, 1958).

La palta representa una importante fuente de alimentación humana, siendo la única fruta conocida que posee todos los elementos nutritivos: glúcidos, proteínas, lípidos, vitaminas, sales minerales y agua (Biale y Young, 1971). La composición del fruto varía según la variedad y la localidad donde se desarrolla, a su vez depende del estado de maduración que se encuentre el fruto. Contiene elevadas cantidades de proteína, presentando un promedio de 1,20- 2,20 %, mientras que la mayoría de las frutas contiene menos del 1,0 %, siendo influenciados estos valores por la región desde donde proviene. Los aminoácidos más importantes están contenidos en la pulpa y corresponden a: leucina, valina, arginina, tirosina (Calabrese, 1992). Otras moléculas presentes en el fruto como los glúcidos, no sufren grandes variaciones porcentuales durante el crecimiento de este. Su contenido durante el momento de la recolección varía mucho según el tipo de cultivar (Calabrese, 1992).

El mesocarpo presenta alcoholes y azúcares poco usuales además de glucosa, fructosa y sucrosa. La palta contiene un 4,5 % de azúcares lo que es muy bajo si se compara con otras frutas (Biale y Young, 1971). En cuanto a los lípidos, la porción comestible de la fruta es rica en ácido oleico, que es el ácido graso dominante y que se acumula preferentemente en las células formando triglicéridos (Calabrese, 1992; Biale y Young, 1971).

Con respecto a las vitaminas, el fruto es rico en éstas, especialmente en aquellas liposolubles. Es una excelente fuente de vitamina A, B, D no así de vitamina C y E las que se encuentran en cantidades bajas (Calabrese, 1992; Biale y Young, 1971).

## **2. Rol del etileno en la coordinación del proceso de maduración en frutos climatéricos.**

El etileno es una de las tantas hormonas vegetales que afecta el proceso de crecimiento y desarrollo, incluyendo la maduración y senescencia (Abeles *et al*, 1992). En plantas superiores, el etileno es sintetizado a partir del aminoácido metionina, el cual es convertido a

s-adenosilmetionina (SAM) mediante la adición de adenina y consumo de ATP. El SAM es transformado a 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), por la enzima ACC- sintetasa (ACS). Finalmente la ACC es oxidada a etileno por la ACC- oxidasa (ACO) (Martínez-Romero *et al.*, 2007). En frutos climatéricos, una vez que el etileno comienza a ser sintetizado en bajas cantidades, su producción interna aumenta rápidamente. El etileno se une a un receptor y la señal es transducida a través de un complejo mecanismo que promueve respuestas biológicas específicas (Martínez-Romero *et al.*, 2007).

### **3. Uso de inhibidores de etileno en frutas para prolongar la vida de postcosecha.**

La maduración es un proceso regulado por etileno en los frutos climatéricos, y por ende el comienzo de este puede ser retrasado por la aplicación exógena de variados compuestos. Uno de estos es la aminoetoxivinilglicina (AVG) que es un inhibidor de la síntesis de etileno (Lieberman, 1979) ya que inhibe competitivamente a la enzima clave de la biosíntesis, la 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) sintasa (Boller *et al.*, 1979; Yu *et al.*, 1979). Otro compuesto es el 1-metilciclopropeno (1-MCP), correspondiente a un ciclopropeno sintético, el cual es un inhibidor de la acción de etileno; este compuesto gaseoso se une al receptor de etileno actuando como un eficiente antagonista, efecto que puede perdurar por un gran tiempo post aplicación (Sisler *et al.*, 2003). El impacto de 1-MCP en la postcosecha de fruta y hortaliza ha tenido dos ramas. Primero, proporciona el potencial para mantener la calidad de frutas y vegetales después de la cosecha; y segundo, el 1-MCP provee una herramienta poderosa para conocer los procesos fundamentales que envuelven la maduración y la senescencia (Watkins, 2002).

En frutas de interés comercial la utilización de compuestos que sean capaces de mantener la calidad y propiedades de los frutos son de gran importancia. Por ejemplo, se ha visto en dos variedades de manzana (*Malus domestica*), Royal Gala y Pink Lady, que la aplicación de AVG en huertos comerciales produce un retraso en la maduración (Phan-Thien *et al.*, 2004) y también se ha observado en ciruelo (*Prunus domestica*) que después de la aplicación de 1-MCP en la postcosecha se observó cambios en el ablandamiento y color del fruto (Lurie y Weksler, 2004). Particularmente en palta para reducir los desórdenes fisiológicos causados por largos períodos de almacenamiento como el pardeamiento de la pulpa (Blankenship y Dole, 2003) se ha utilizado 1-MCP. Se recomienda que la fruta se almacene en bajas concentraciones de etileno (Chaplin *et al.*, 1983), porque el etileno estaría de alguna manera involucrado en el pardeamiento de la pulpa (Pesis *et al.*, 2002). La

aplicación de 1-MCP en palta cv. Hass demostró que produce un retraso en la maduración comercial en fruta no almacenada en frío (Feng *et al.*, 2000; Hofman *et al.*, 2000; Adkinset *et al.*, 2004) y en fruta mantenida a baja temperatura (Pesis *et al.*, 2002). Además reduce la aparición de desórdenes fisiológicos asociados a largos períodos de almacenamiento, entre 4–7 semanas (Woolf *et al.*, 2004). En resumen el 1–MCP puede efectivamente disminuir el ablandamiento, mantener el color verde de la piel durante el almacenamiento y reducir la incidencia de desórdenes fisiológicos de las paltas maduras (Woolf *et al.*, 2004). Sin embargo, el efecto beneficioso de 1–MCP en reducir los desórdenes fisiológicos produce un problema en el mercado exportador, ya que genera un excesivo atraso en la maduración del fruto, el cual puede afectar su comercialización (Woolf *et al.*, 2004).

#### **4. Daño por frío (*Chilling Injury*) en frutos.**

El almacenamiento a bajas temperaturas es una tecnología de postcosecha la cual es ampliamente utilizada para extender la vida de postcosecha de diferentes frutos. El almacenamiento refrigerado de frutos y vegetales permite la preservación de sus cualidades después de la cosecha, porque las bajas temperaturas disminuyen el metabolismo celular y atrasan la senescencia y maduración de los frutos (McGlasson *et al.*, 1979; Hardenburg *et al.*, 1986). Sin embargo, ciertos frutos tropicales y subtropicales no son tan tolerantes a este tipo de almacenamiento, ya que causa la aparición de desordenes fisiológicos los cuales afectan negativamente la calidad de ellos, este conjunto de alteraciones es conocido como *Chilling Injury* (CI). Estos desordenes fisiológicos son manifestados a temperaturas sobre los 0 °C (Lyons, 1973). Los síntomas de CI pueden ser observados en todos los estados de desarrollo de la planta, pero su intensidad depende del tiempo, temperatura de almacenamiento, del tipo de órgano de la planta y el estado de desarrollo. Estos síntomas se pueden clasificar en 2 categorías, i) desordenes en el desarrollo, tales como maduración incompleta y deficiencia en el sabor y aroma; ii) aparición de diferentes síntomas como, pardeamiento interno y externo, infiltración de agua en espacios intracelulares, pardeamiento de membranas carpelares y una baja resistencia a daños mecánicos y ataques microbianos y fúngicos (Artes *et al.*, 2003; Lurie *et al.*, 1997). Se ha observado que los síntomas de estos desordenes fisiológicos son más evidentes cuando los frutos y vegetales son transferidos a temperatura ambiente después del período de almacenamiento a bajas temperaturas (Parkin *et al.*, 1989; Shewfelt *et al.*, 1991). En el caso particular de los frutos, la sensibilidad al CI durante el almacenamiento a bajas temperaturas puede ser dependiente del estado de madurez. En el caso del plátano (*Musa*

*paradisiaca*), los frutos son más sensibles al CI cuando los racimos están en un estado avanzado de madurez (Pantastico *et al.*, 1967). Pero en paltas, melón (*Cucumis melo*) y tomate (*Solanum lycopersium*), la tolerancia al CI es alta en los estados postclimático, una vez que la producción autocatalítica de etileno ha comenzado y coincide con el último estado de maduración de los frutos (Kosiyachinda *et al.*, 1976, Autio *et al.*, 1986)

##### **5. Desórdenes fisiológicos en *Persea americana* Mill.**

Los desórdenes fisiológicos corresponden a una alteración en los tejidos del fruto, no originados ni por patógenos ni por daños mecánicos. Pueden generarse en respuesta a un ambiente adverso, especialmente de temperatura o composición atmosférica, como a deficiencias nutricionales (principalmente de calcio) durante el crecimiento y desarrollo del fruto (Wills *et al.*, 1981). Estudios realizados por Eaks (1976) demostraron en paltas, una interacción entre tiempo y temperatura de almacenaje en la incidencia de desórdenes fisiológicos asociados a daño por frío, mientras que Zauberman *et al.* (1985), señala que el almacenaje de paltas a temperaturas inferiores a 10°C, pero mayores de 0°C por períodos relativamente largos, siempre provoca daño por frío.

Las principales alteraciones fisiológicas al almacenar paltas son: pardeamiento externo, pardeamiento de pulpa, manchas de la pulpa y pardeamiento vascular, todas ellas asociadas generalmente a daño por frío (Aguirre *et al.*, 1995). A su vez el cultivar Hass tiene un mayor porcentaje de fruta sin desórdenes fisiológicos en la postcosecha cuando es comparada con la variedad Fuerte (Kremer-Köhne y Köhne, 1992), lo cual desde el punto de vista comercial es muy importante para tomar en cuenta por la distancia a la cual se encuentran los mercados.

##### **Pardeamiento externo.**

Es tal vez el síntoma más claramente asociado a daño por frío en los cultivares que en un estado de madurez normal presentan piel de color verde. En casos leves, se presenta como puntuaciones necróticas, y en daños severos se presenta como manchas irregulares que con el tiempo se oscurecen hasta ponerse pardas o casi negras, como se puede observar en la figura 1 (Aguirre, 1994). En casos severos, las manchas abarcan gran superficie y adquieren consistencia coriácea (Maraboli y Molinos, 1987). La mancha se caracteriza por estar claramente definida, presenta una depresión de la piel en el límite entre la zona afectada y la



sana, se limita solamente a la piel y o penetra a la pulpa, por último, aparece a los pocos días de estar sometida la fruta a temperaturas bajas (Peralta, 1977; Swarts, 1984).



**Fig 1.** Pardeamiento externo en frutos de paltas cv. Hass.

### **Pardeamiento de pulpa.**

Es conocido también como pardeamiento interno. Este desorden se puede originar principalmente como respuesta a una baja temperatura de almacenaje (Van Lelyveld y Bower, 1984). En Sudáfrica este desorden se ha presentado en fruta de cosechas tardías sin almacenaje refrigerado (Cutting *et al*, 1992).

En esta anomalía, en la zona amarilla de la pulpa, se presenta un área de coloración difusa pardo grisácea o parda, extendiéndose desde la porción distal adyacente a la semilla, comprometiendo toda la pulpa en casos severos, observar figura 2 (Luza *et al.*, 1979; Berger *et al.*, 1982). En cv. Fuerte, a medida que se retrasa la cosecha, el pardeamiento de pulpa aumenta su incidencia (Peralta, 1977; Carrillo, 1991; Barrientos, 1993); en cambio, Berger *et al* (1983) obtuvieron un efecto contrario en el cv. Hass, lo que se atribuye a factores de precosecha. Según Cutting *et al.*, (1992), el pardeamiento de pulpa es esencialmente un desorden asociado al almacenaje refrigerado, incrementándose el problema en fruta almacenada a 5,5°C cosechada tardíamente, o bien puede presentarse en cosechas tardías en fruta madurada directamente después de recolectada.



**Figura 2.** Pardeamiento de pulpa en frutos de paltas cv. Hass.

### **Pardeamiento vascular.**

Se describe también como pardeamiento u oscurecimiento de fibras, en donde los haces vasculares cambian de color de verde claro amarillento a pardo claro o negro, como en la figura 3 (Aguirre *et al.*, 1995). Los primeros síntomas, generalmente, aparecen en la porción distal del fruto como un punteado, pudiendo extenderse a lo largo de la pulpa en casos severos (Peralta, 1977; Berger *et al.*, 198; Lizana *et al.*, 1992). Puede presentarse con mayor intensidad en la zona distal y basal del fruto (Aguirre, 1994).

De acuerdo a Swarts (1984), el síntoma se hace visible cuando la fruta es cortada, pero luego de exponerse a temperatura ambiente se hace más pronunciado, asociándose, además, a un deficiente control de la temperatura.



**Figura 3.** Pardeamiento vascular en frutos de paltas cv. Hass.

## **6. El efecto de la época de cosecha del fruto *Persea americana* Mill en el desarrollo de desórdenes fisiológicos.**

En Chile, la palta que se cosecha tempranamente entre agosto y octubre y se almacena aproximadamente por 30 días (dependiendo del destino) a 5°C, presenta un mayor potencial de almacenamiento comparada con aquellas paltas que se cosechan en una etapa más tardía, entre Noviembre y Enero (Undurraga *et al.*, 2003). Esta reducción en el potencial de almacenamiento de la fruta cosechada tardíamente se debe principalmente al desarrollo de desórdenes fisiológicos especialmente pardeamiento de la pulpa. De la misma forma, la época de cosecha para la palta cv. Hass en Nueva Zelanda es entre Agosto y Marzo, en donde se ha visto que después del período de almacenamiento la fruta cosechada entre los meses de Enero y Marzo tienden a desarrollar más desórdenes fisiológicos que la fruta cosechada entre Octubre y Noviembre (Dixon, 2003).

Es posible que el incremento en la incidencia de desórdenes en la palta cosechada en forma tardía es debido a cambios composicionales en el fruto que incrementa la susceptibilidad de esta a desórdenes después de la cosecha (Lallu *et al.*, 2005). También se deben considerar los factores de precosecha, los cuales pueden influir tanto en la tasa de desarrollo como la tasa de maduración de la fruta, por lo tanto es importante saber en qué momento se recomienda llevar a cabo la cosecha (Ferguson *et al.*, 1999).

## **7. Contenido de aceite e índice de maduración en *Persea americana*.**

Uno de los componentes más importante de la palta, el cual también está en estrecha relación con la aclimatación de las plantas a las bajas temperaturas corresponde a los lípidos, los cuales componen el 60-80% de la materia seca del mesocarpo (parte comestible de la fruta) (Requejo *et al.*, 1999). Los tipos de lípidos que presenta la palta incluye tri-dimnoglicéridos, en frutos maduros aproximadamente el 85% de estos lípidos son triglicéridos y están normalmente destinados como material de almacenamiento para proporcionar carbón y energía. Respecto al contenido de ácidos grasos, los más abundantes en el mesocarpo de la palta corresponden a: 75,1% de oléico, 8,6% de palmítico, 8,7 % linoléico, 1,4% de palmitoléico y 0,7% de linolénico (Requejo-Tapia *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2007).

Tanto el contenido de aceite como el peso seco y el tamaño del fruto son utilizados como índice de maduración (Demirkol y Pekrezci, 1999). Respecto al contenido de aceite este se utiliza como parámetro para analizar el estado de madurez de la palta para su cosecha; Chile como estándar tiene como requisito que las paltas tengan un 8% de aceite como mínimo

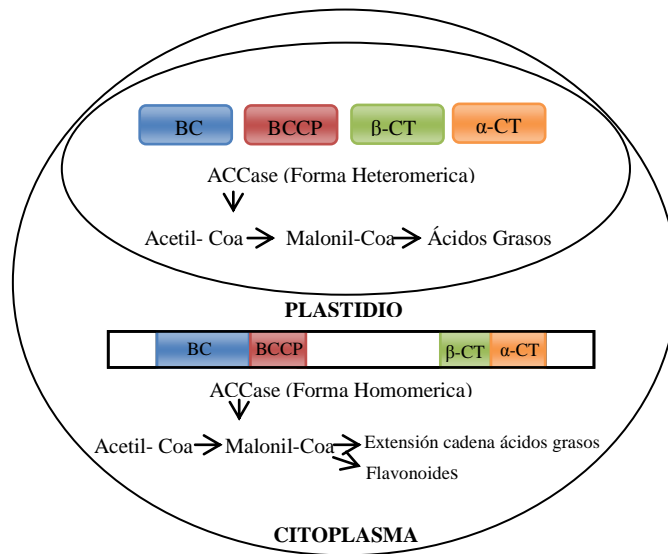
para que este pueda ser cosechado. Sin embargo, el contenido de aceite varía dependiendo de las características del cultivar (variedad) y época de cosecha (Lee y Young, 1993; Demirkol y Pekrezci, 1999; Knight, 2002).

## **8. Biosíntesis de lípidos en plantas.**

En las plantas la biosíntesis de lípidos ocurre exclusivamente en los plastidios y es iniciado por la enzima acetil coa carboxilasa (*ACCase*), cual convierte el acetil CoA a malonil CoA. Posteriormente el grupo malonil es transferido a una proteína transportadora de acil (ACP) formando al malonil-ACP. Este último entra a una serie de reacciones de condensación, deshidratación y reducción que resulta en la adición de 2 moléculas de carbono a la cadena acil por cada ciclo, culminando con la formación de los ácidos grasos saturados palmitato (16:0) y estearato (18:0). Por último los ácidos grasos son desaturados por la adición de uno o más doble enlaces, donde el primer doble enlace es introducido por la enzima estearoil acp desaturasa (SAD) (Kachroo A. y Kachroo P., 2009). La biosíntesis de lípidos es afectada por factores ambientales, los cuales alteran los niveles de lípidos en las plantas, estos corresponden a: la luz, temperatura, estrés hídrico, constituyentes del suelo y atmosférico y otros factores, tal como, daño físico y ataque de patógenos (Salas *et al.*, 2000)

### **8.1. Enzimas claves en la biosíntesis de lípidos.**

Como se explicó anteriormente la biosíntesis de lípidos en plantas ocurre dentro de los plastidios, donde su precursor principal y más importante es el acetil-CoA, el cual es utilizado por la enzima Acetil-CoA Carboxilasa (*ACCase*) para generar el producto malonil – CoA (Slabas *et al.*, 2002). Respecto a esta enzima, existen 2 diferentes isoformas: (i) la tipo I u homomérica, la cual consiste de un sólo gran polipéptido que contiene 3 dominios funcionales: el de la proteína transportadora de carboxil biotina (BCCP), el dominio carboxil transferasa (CT) y biotina carboxilasa (BC); y (ii) la tipo II o heteromérica que consta de 4 polipéptidos separados; BCCP, BC, CT<sub>α</sub> y CT<sub>β</sub> (Sasaki *et al.*, 1993); en donde el polipéptido CT<sub>β</sub> es codificado por el genoma plastidial y los otros tres en el genoma nuclear (Sasaki y Nagano, 2004) (Figura 4).



**Figura 4.** Compartimentalización de 2 isoformas de *Acetil-Coa Carboxilasa* (*ACCase*) en plantas. (Modificado de Sasaki y Nagano, 2004)

La forma homomérica es generalmente encontrada en procariontes y la forma heteromérica está presente en los plastidios de eucariotas (Sasaki y Nagano, 2004), sin embargo algunas plantas poseen ambas formas. El malonil-CoA generado por la forma heteromérica, es esencial para la síntesis de ácidos grasos en los plastidios (Harwood, 1988). En cambio, el malonil-CoA generado por la forma homomérica generalmente es encontrado en el citosol (Sasaki y Nagano, 2004), y es requerido para la síntesis de flavonoides y ácidos grasos de cadena larga (Ebel y Hanlbrock, 1977; Schröder *et al.*, 1988; Roesler *et al.*, 1994). Esta enzima que es clave para la biosíntesis de lípidos, es altamente regulada a nivel transcripcional, post transcripcional y actividad enzimática (Sasaki y Nagano, 2004).

Tomando en cuenta la importancia de la biosíntesis de lípidos, otra enzima que además presenta una estrecha relación con la aclimatación a bajas temperaturas de las plantas, es la esteroil-ACP desaturasa (SAD), la cual se localiza en el estroma de los plastidios y se encarga de catalizar la desaturación de esteroil-ACP a oleoil-ACP. SAD cumple una función muy importante en determinar la proporción de ácidos grasos saturados/insaturados en plantas (Lindqvist *et al.*, 1996) y esta proporción está relacionada a muchas funciones en las plantas especialmente a la aclimatación a bajas temperaturas (kodama *et al.*, 1995). En estudios realizados en papa (*Solanum tuberosum* L), SAD estaría implicada en la modificación de los lípidos de membrana, y se sugiere que la expresión del gen SAD en plantas puede incrementar

la tolerancia al frío debido al incremento en la desaturación de los ácidos grasos de la membrana (De Palma *et al.*, 2008).

## **8.2. Rol de los lípidos en la aclimatación a bajas temperaturas.**

Los lípidos no solamente son importantes del punto de vista de la calidad para la dieta, sino también como parte del sistema de defensa de las plantas frente a un estrés abiótico como el frío, el cual tiene un efecto negativo en el desarrollo y crecimiento de la planta (Wolfe, 1978). El metabolismo de lípidos, tiene una función muy importante en el mecanismo de tolerancia de algunas plantas al frío. Uno de los sistemas como las plantas se adaptan a las bajas temperaturas es modificando la fluidez de la membrana celular de una consistencia líquida a una cristalina, lo que es logrado mediante un incremento de los niveles de desaturación de los lípidos de membrana (Wolfe, 1978), y también mediante una serie de cambios a nivel transcripcional de genes (Badea y Basu, 2009). Respecto al aumento de los niveles de desaturación, esto se refiere específicamente al aumento de los ácidos grasos insaturados (Tasseva *et al.*, 2004; de Palma *et al.*, 2008). Se ha observado en semillas de soya (*Glycine max*) que la composición de ácidos grasos tanto de fosfolípidos (Dornbos *et al.*, 1989) y triglicéridos (Wolf *et al.*, 1982) es alterada cuando se modifica la temperatura de crecimiento de las semillas. Cuando se hizo crecer las semillas bajo condiciones de frío se observó que los niveles de ácidos grasos polinsaturados aumentaron (Dornbos *et al.*, 1989; Wolf *et al.*, 1982), a su vez se ha reportado que en papa los lípidos de membrana frente a bajas temperaturas tienden a cambiar su composición mostrando un aumento de alrededor de 5-10% de ácidos grasos insaturados (De Palma *et al.*, 2008). También en paltas cultivadas bajo condiciones de frío tienden a generar más ácidos grasos insaturados durante el desarrollo cuando es comparada con frutos crecidos en condiciones cálidas (Requejo-Tapia *et al.*, 1999).

Sobre la base de los antecedentes presentados anteriormente planteamos la siguiente hipótesis de trabajo.

### **Hipótesis**

Los desórdenes fisiológicos observados en las cosechas tardías de paltas cv. Hass serían causados por la alteración en la expresión de los genes que codifican para Esteroil ACP desaturasa (PamSAD) y Acetil CoA carboxilasa (PamACCCase), las cuales son enzimas claves del metabolismo de lípidos.

### **Objetivo General**

Analizar la existencia de una correlación entre la expresión de *Esteroil ACP desaturasa (PamSAD)* y *Acetil coa carboxilasa (PamACCCase)* y la incidencia de desórdenes fisiológicos en paltas Hass

### **Objetivos Específicos**

1. Caracterización molecular de dos subunidades de la enzima Acetil CoA carboxilasa (PamACCCase) perteneciente a *Persea americana*.
2. Estudiós de expresión de *Esteroil ACP desaturasa (PamSAD)* y *Acetil CoA carboxilasa (PamACCCase)* en frutos que presentaron desórdenes fisiológicos.

## Materiales y Métodos

**Objetivo específico 1:** Caracterización molecular de dos subunidades de la enzima Acetil coa carboxilasa (PamACCCase) perteneciente a *Persea americana*.

### 1. Obtención del transcrito de largo completo.

A partir de 2 ESTs (*Expressed sequence tags*) de la enzima heteromérica *acetil coa carboxilasa* de *Persea americana*, correspondiente a las subunidades *biotina carboxilasa* de 713 bp (*PamACCCase BC*) (acceso: FD508677) y proteína transportadora de *carboxil biotina* de 463 bp (*PamACCCase BCCP*) (acceso: CV001974), se logró completar los transcritos utilizando el método 5'-3'RACE (Rapid Amplification of cDNA end) según protocolo del fabricante. El cDNA RACE utilizado en este método se obtuvo a partir de un mix de RNA de diferentes tejidos de palta (fruto maduro, fruto inmaduro, flor, botón y hoja). Con esta metodología se permite la generación de secuencias específicas para una amplificación mediante el procedimiento indicado por el Kit GeneRacer<sup>TM</sup>. Los fragmentos obtenidos por el método 5'-3'RACE se analizaron por una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para obtener los transcritos de largo completo se diseñaron los siguientes partidores: *PamACCCase BC*, 5'CCAGAGGGCACGTATGCAGTT 3', 5'TTTCCCTCGCAGTAGCTTTATC 3', ambos partidores utilizados para completar el extremo 5' del gen y 5'CTGTTTATGCTGTATTTCTGACTG 3' utilizado para completar el extremo 3' del gen; *PamACCCase BCCP*: 5'GGCAGGAACATTCTATCGGAGC 3' utilizado para completar el extremo 3' del gen y los partidores , 5'TCAATGATGCACAACACTTGTCC 3', 5'ATAGCTGCTGGAGGGGAGGGT 3', 5'ATGGTTCATTGGCATCCTTGTCT 3', para completar el extremo 5' del gen. Los partidores fueron diseñados utilizando el software Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto, Usa) y sintetizados por alpha DNA (Montreal, Canadá).

### 2. Clonación y transformación.

Los fragmentos de cDNA obtenidos por el método RACE-PCR fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega, usa), donde se utilizó 2 ul del producto RACE-PCR y 1 ul del vector, los cuales fueron dejados toda la noche a 4°C. Se realizó el protocolo de transformación de bacterias de *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$  con el vector recombinante según recomendaciones del fabricante. Los clones seleccionados positivamente se les realizó la



extracción de DNA plasmidial utilizando el kit, Plasmid Mini Kit II (OMEGA, usa), acorde a las recomendaciones del fabricante, y finalmente se envió a secuenciar mediante un sistema automatizado (Macrogen, Corea).

### 3. Análisis Bioinformáticos

#### *Predicción señal de destinación*

La señal de destinación de *PamACCcase BC* fue predicha mediante TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) utilizando una base de datos para plantas. Se analizó los primeros 70 aminoácidos del extremo 5' de la secuencia aminoacídica para la predicción y posible sitio de corte de la señal de destinación. Para *PamACCcase BCCP* se utilizó 2 servidores para la predicción de la señal de destinación, ChloroP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) y TargetP 1.1, para ambos se utilizó los primeros 70 aminoácidos del extremo 5' de la secuencia aminoacídica.

#### *Búsqueda de secuencias ortólogas*

Para la búsqueda de secuencias ortólogas se utilizó el servidor BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), en donde se seleccionó solo secuencias provenientes de plantas, y que tuvieran un score alto, porcentaje de identidad sobre 80% y bajo E-value.

#### *Identificación de dominios y motivos protéicos.*

La búsqueda de dominios y motivos conservados fue realizada mediante un alineamiento múltiple utilizando el algoritmo Clustal W, mediante el software clustalx1.83 (<http://www.clustal.org/download/1.X/ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>). Para el análisis de dominios estructurales se utilizó los servidores Expasy proteomics (<http://www.expasy.ch/tools/blast/>) e InterProScan(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) Para complementar los análisis de similitud se realizó un análisis filogenético donde se utilizó el software MEGA 4.1 (<http://www.megasoftware.net/mega41.html>).

#### *Búsqueda de ORF (Open Reading Frame)*

Para la predicción de marcos de lecturas (ORF) se utilizó el servidor ORFinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>).

### *Análisis de 5' y 3' UTR*

Para los análisis de las secuencias UTR (untranslated región) se utilizó el servidor UTRdb (<http://utrdb.ba.itb.cnr.it/getutr/5ATHR017101>), en donde se selecciono para los análisis secuencias correspondiente a diferentes especies de plantas.

### *Calculo Punto isoeléctrico (PI) y peso molecular*

Para el cálculo teórico del PI y peso molecular se utilizó el servidor Expasy proteomics ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)).

**Objetivo específico 2:** Estudiós de expresión de *Estearoil acp desaturasa (PamSAD)* y *Acetil coa carboxilasa (PamACCCase)* en frutos que presentaron desórdenes interno.

#### 4. Cosecha y manejo de la fruta.

Las paltas se cosecharon de la Estación Experimental La Palma de la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso ubicada en la localidad de Quillota (latitud 32° 40`s, longitud 71° 16`w) en 3 oportunidades: las primera cosecha se realizó el 30 de Octubre de 2009, la segunda se realizó el 4 de febrero de 2010 y las última se realizó el 18 de marzo de 2010 para poder observar daños en los frutos causado por el proceso de senescencia. Una vez cosechados los frutos fueron trasladados al laboratorio de postcosecha de INIA CRI La Platina, donde luego fueron embalados en cajas plásticas de dimensiones 500x300x150 mm, los frutos fueron colocados al interior de bolsas perforadas con camisas de papel en su interior para reducir la deshidratación.

#### 5. Medición del contenido de aceite.

La medición de este parámetro se realizó a los frutos de llegada correspondiente a cada cosecha, a través del porcentaje de materia seca de los frutos, donde a cada fruto se le extrajo una rodaja transversalmente (sólo tejido del mesocarpo) y fue cortada en fragmentos pequeños. Los frutos se secaron en una estufa (estufa de secagem, Quimis) a 103°C constante por 24 horas. Las muestras se pesaron en fresco y una vez sacadas de la estufa se determinó el peso seco de ellas. Las mediciones se realizaron en una muestra compuesta por 6 frutos. El resultado se expresó en porcentaje (%) de aceite utilizando la siguiente ecuación de regresión simple descrita por Paola Esteban, 1993:

$$Y = 53,484 - (0,5767 \cdot [\% \text{ de humedad}]).$$

## 6. Tratamientos

En la tabla 2 se observa los diferentes tratamientos realizados en esta tesis:

**Tabla 2.** Tratamientos para frutos de paltas cv. Hass

<b>Tratamientos</b>	<b>Temperatura de almacenamiento (°C)</b>	<b>Días almacenados en refrigeración</b>
<b>Control</b>	5°C	30 y 40
<b>1-MCP</b>	5°C	30 y 40
<b>Control</b>	0°C	30 y 40

Un grupo de frutos se conservaron como control sin aplicaciones del inhibidor de etileno (1-MCP). Otro grupo determinado de frutos se le aplicó una concentración de 300ppb (partes por billón) de 1-metilciclopropeno1-MCP (SmartFresh™) durante 12 horas a 5°C, las condiciones de aplicación correspondieron a las comercialmente utilizadas para las condiciones Chilenas.

## 7. Almacenamiento y evaluaciones.

Los frutos de todas las cosechas fueron almacenados por 30 y 40 días a dos temperaturas 0 y 5°C. Los frutos de cada uno de los tratamientos fueron evaluados a la salida de almacenamiento refrigerado y luego de un período a 20°C hasta alcanzar madurez de consumo posterior a cada almacenamiento refrigerado. En cada una de las oportunidades se evaluaron los siguientes parámetros:

- i) Firmeza de pulpa: se midió con un penetrometro Effegi de embolo 4 mm en n= 20 frutas a salida de almacenamiento refrigerado y con un embolo 8 mm a madurez de consumo en n= 25, luego de un período a 20°C, Se utilizó la media de ambos valores medidos y los resultados se expresaron en Kg-f (kilogramo fuerza).
- ii) El color de piel: se midió utilizando una escala no paramétrica de rango 1 a 5, donde el número 1 corresponde a frutos verdes, con un aumento de la intensidad de coloración de los frutos hacia negro que corresponde al número 5. La medición se realizó al inicio del ensayo y en cada evaluación.

- iii) Los desordenes fisiológicos (Pardeamiento de pulpa, vascular y externo): se hizo utilizando una escala arbitraria de daño, de rango 1 a 5, donde el número 1 corresponde a frutos sin daño y con un aumento en la severidad de este hasta 5, que corresponde a frutos con daño severo. La medición se realizó al inicio del ensayo y en cada evaluación.

Un total de 6 frutos correspondientes a cada medición: a cosecha, salida del almacenamiento refrigerado y cuando alcanzaron madurez de consumo, fueron trozados, congelados en nitrógeno líquido y finalmente almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis molecular.

#### 8. Extracción, cuantificación y verificación de la integridad de RNA.

Se realizó la extracción de RNA total de frutas de llegada, tratamiento en frío ( $5^{\circ}\text{C}$  y  $0^{\circ}\text{C}$ ) y 1-MCP, usando el método de hot borate (Wan y Wilkins, 1994) en el cual se utilizó 3g de muestra. La integridad de los RNA obtenidos se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa-formaldehido al 1% en donde se detecto las regiones 18S y 28S del RNA ribosomal. Cada una de las muestras fue cuantificada por espectrofotometría midiendo su absorbancia a 260nm, y a partir de ello se relacionó las  $\text{OD}_{260}$  con la concentración de RNA, según la relación  $1\text{OD}_{260} = 40\text{ug/ml}$ .

#### 9. Síntesis y verificación de cDNA.

Se prepararon diluciones de  $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de RNA, las cuales se utilizaron para la síntesis de cDNA de hebra simple mediante una reacción de transcripción inversa utilizando la enzima MMLV-RT (Promega, Madison, USA), primer de oligo dT (Invitrogen, Breda, the Netherlands), acorde a los procedimientos estándar y recomendados por el fabricante, por otra parte se realizó la adición de mRNA del gen DAP (GenBank, L38424), en concentraciones conocidas ( $2\text{ng}/\mu\text{l}$ ), el cual se usó para efectos de normalización de datos de expresión en qPCR (González-Agüero M. *et al*, 2008) y también para facilitar la búsqueda de genes de expresión constitutiva. Los cDNA fueron cuantificados por espectrofotometría midiendo su absorbancia a 260nm, y a partir de ello se relacionó la  $\text{OD}_{260}$  con la concentración de cDNA, según la relación  $1\text{OD}_{260} = 30\text{ug/ml}$  para luego diluir los cDNA a una concentración de  $50\text{ng}/\mu\text{l}$ . Una vez finalizado lo anterior se verificó la síntesis de cDNA. Para esto se llevó a cabo una reacción PCR con los primers sentido ( $5'\text{TTGCATTAGAGCACGGAGTC } 3'$ ) y antisentido ( $5'\text{GCGTATCTGAAGCGTTTG } 3'$ ) del gen *dap* el cual produce un amplicón de

431bp, esto es utilizado como control de la síntesis de cDNA; a su vez se amplificó utilizando el partidor sentido (5'CGTTGCCCAGAGGTCCTATT 3') y antisentido (5'AAGTGCTGAGGGATGCCAAGA 3') del gen actina, el cual produce un amplicón de 289bp, esto es utilizado para ver la calidad de los cDNA. Los amplicones fueron verificados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### 10. Amplificación por PCR a partir de cDNAs.

Se usó 50ng de cDNA como templado, junto con los partidores diseñados utilizando el software Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto, Usa) y sintetizados por alpha DNA (Montreal, Canadá), en un PCR común en donde los ciclos dependieron principalmente de cada caso dado por los partidores y el gen en cuestión. Los parámetros de reacción y los ciclos de amplificación (desde 25 a 35 ciclos), dependieron de las secuencias a amplificar, siguiendo en general el siguiente esquema: denaturación 94°C por 30 segundos, alineamiento 52-66 °C por 30 segundos, extensión 72°C por 1 a 3 minutos, y en algunos casos una extensión final a 72°C por 5 a 10 minutos. Finalmente las muestras de cada reacción fueron sometidas a un análisis electroforético.

#### 11. Análisis de expresión en PCR cuantitativo en tiempo real (q-PCR).

Se utilizó el cDNA simple hebra sintetizado a partir de las muestras extraídas anteriormente para la amplificación de los genes *PamSAD*, *PamACCcase BC*, *PamACCcase BCCP*, *PamACO* y *PamRubisco* correspondientes a *Persea americana*. Las reacciones de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) se llevaron a cabo en el equipo Light Cycler instrument de Roche, bajo las siguientes condiciones generales: 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X LC-FastStart DNA Master SYBR Green I 10x (Roche), 0,5 µM de cada partidor, 2 ng de cDNA, en 20 µL de reacción, los programas de amplificación fueron diseñados por el software Light cycle software v3.5 (Roche), los que incluyeron una etapa de activación y amplificación, los productos de la amplificación fueron verificados en geles de agarosa al 1% para analizar la aparición de amplificaciones inespecíficas. Para cuantificar los transcritos amplificados se utilizó el programa Light Cycler software v3.5, a través de la interpolación de una curva de calibración generada a partir de diluciones (10 a 0,01 pg/ul) de DNA de concentración conocida del gen en estudio, la cual se obtuvo a través del proceso de purificación de banda utilizando el kit Wizard® purification systems mediante las recomendaciones del fabricante, para *PamSAD*, *PamACCcase BC*, *PamACCcase BCCP*, *PamACO* y *PamRubisco* en donde se

obtuvo un stock de cada gen con una concentración de 10ng/ul. Se calculo el número de cada transcrito por picogramo de producto. Para luego establecer la abundancia de cada gen en las muestras estudiadas, se normalizo con respecto a un gen de expresión constitutiva (*Housekeeping*) que corresponde a *PamRubisco* el cual se utilizó para establecer diferencias respecto a ellas.

## 12. Análisis estadístico

Los resultados para la expresión diferencial de los transcritos, y los parámetros de madurez de los frutos, se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) a través de una comparación múltiple de LSD ( $p < 0,05$ ) utilizando el programa StatGraphics Plus 5.1. Para el análisis de la expresión diferencial de los transcritos, se utilizó 6 frutos (replicas biológicas) y 2 repeticiones por cada uno (replica experimental); en el caso del análisis de los parámetro de madurez, se utilizaron 20 frutos para aquellos que salían del almacenamiento refrigerado y 25 frutos para los que alcanzaban la madurez de consumo.

## Resultados

### 1. Caracterización del estado de madurez de los frutos.

Para evaluar el estado de madurez de los frutos se midieron una serie de parámetros, tales como: firmeza de pulpa, color de piel, contenido de aceite y desórdenes fisiológicos. Estos parámetros fueron medidos al momento de la cosecha, luego del almacenamiento refrigerado y cuando alcanzaron la madurez de consumo posterior a un período de almacenamiento a 20°C (“Shelf life”).

#### 1.1. Firmeza de pulpa.

Se realizó la medición de la firmeza de pulpa (expresada en kilogramo-fuerza) de paltas cv. Hass utilizando un presionómetro cuya metodología es explicada en materiales y métodos.

En lo que dice relación con la firmeza de pulpa a cosecha, en general se observó una alta firmeza, sin embargo existió una disminución de esta en la medida que las cosechas fueron más tardías (Tabla 3). Es así como los frutos de la tercera cosecha presentaron una firmeza de pulpa de casi 4 kgf menos que los provenientes de la primera cosecha (Tabla 3).

En cuanto a la firmeza de pulpa durante almacenamiento refrigerado, se observó una tendencia similar para los frutos de todas las cosechas, observándose en general una buena firmeza luego de almacenamiento refrigerado. Mostrando los frutos de la tercera cosecha un mayor grado de ablandamiento durante almacenamiento refrigerado (Tablas 4,5 y 6). Para todas las cosechas los frutos aplicados con 1-MCP mostraron una mayor retención en la firmeza de pulpa durante almacenamiento refrigerado a 5°C (Tablas 4,5 y 6). En lo que dice relación a las temperaturas, en todas las cosechas los frutos que fueron almacenados a 0°C mostraron una mayor firmeza que los frutos control a 5°C, mostrando en algunos casos una firmeza similar a los frutos aplicados con 1-MCP y almacenados a 5°C (Tablas 4,5 y 6).

**Tabla 3.** Firmeza de pulpa (Kgf) en palta cv. Hass a la llegada de cada cosecha.

Cosecha	Fecha	Promedio <sup>1,2</sup>	DS <sup>3</sup>
I	30/10/2009	30,7 a	1,2
II	04/02/2010	27,7 b	1,2
III	18/03/2010	26,0 c	1,5

<sup>1</sup>Valores corresponden a los promedios de las muestras en Kgf, (n = 20).

<sup>2</sup>Letras diferentes en la columna representa diferencias significativas utilizando un análisis Anova con LSD <0,05.

<sup>3</sup>Valores corresponden a la desviación estándar (DS).

**Tabla 4.** Firmeza de pulpa (Kgf) en palta cv. Hass correspondiente a la 1<sup>ra</sup> cosecha, evaluados a la salida del almacenamiento por 30 y 40 días a 5°C y 0°C y cuando alcanzaron la madurez de consumo (“Shelf life”).

Temperatura (°C)	Tratamiento	Salida de frío		“Shelf life”	
		30 días <sup>1</sup>	40 días <sup>1</sup>	30 días <sup>1,2</sup>	40 días <sup>1,3</sup>
5	Control	18,2 b	15,7 b	1,2 b	0,7 b
	1-MCP	30,2 a	29,7 a	0,6 c	0,7 b
0	Control	30,1 a	30,5 a	2,3 a	1,3 a

<sup>1</sup>Firmeza de pulpa en Kgf donde los valores corresponden a los promedios y letras diferentes en las columnas representa diferencia significativa utilizando un análisis Anova con LSD,  $p < 0,05$

<sup>2</sup>Días en SL de los frutos, control 5°C 4 SL, tratamiento 1-MCP 9 SL, Control 0°C 4 SL.

<sup>3</sup>Días en SL de los frutos, control 5°C 4 SL, tratamiento 1-MCP 11,5 SL, Control 0°C 5 SL.

**Tabla 5.** Firmeza de pulpa en palta cv. Hass correspondiente a la 2<sup>da</sup> cosecha, evaluados a la salida del almacenamiento por 30 y 40 días a 5°C y 0°C y cuando alcanzaron la madurez de consumo (“Shelf life”).

Temperatura (°C)	Tratamiento	Salida de frío		“Shelf life”	
		30 días <sup>1</sup>	40 días <sup>1</sup>	30 días <sup>1,2</sup>	40 días <sup>1,3</sup>
5	Control	27,60 c	21,05 c	0,52 b	0,65 b
	1-MCP	28,84 a	30,19 a	0,59 b	3,43 a
0	Control	26,62 c	27,62 b	0,93 a	1,09 b

<sup>1</sup>Firmeza de pulpa en Kgf donde los valores corresponden a los promedios y letras diferentes en las columnas representa diferencia significativa utilizando un análisis Anova con LSD,  $p < 0,05$

<sup>2</sup>Días en SL de los frutos, control 5°C 4 SL, tratamiento 1-MCP 10 SL, Control 0°C 5 SL.

<sup>3</sup>Días en SL de los frutos, control 5°C 3 SL, tratamiento 1-MCP 6 SL, Control 0°C 6 SL.

**Tabla 6.** Firmeza de pulpa en paltas cv. Hass correspondiente a la 3<sup>ra</sup> cosecha, evaluados a la salida del almacenamiento por 30 y 40 días a 5°C y 0°C y cuando alcanzaron la madurez de consumo (“Shelf life”).

Temperatura (°C)	Tratamiento	Salida de frío		“Shelf life”	
		30 días <sup>1</sup>	40 días <sup>1</sup>	30 días <sup>1,2</sup>	40 días <sup>1,3</sup>
5	Control	11,68 b	12,61 b	0,93 c	0,90 b
	1-MCP	26,71 a	23,94 a	1,58 b	1,12 ab
0	Control	26,94 a	21,34 a	5,40 a	1,31 a

<sup>1</sup>Firmeza de pulpa en Kgf donde los valores corresponden a los promedios y letras diferentes en las columnas representa diferencia significativa utilizando un análisis Anova con LSD,  $p < 0,05$

<sup>2</sup>Días en SL de los frutos, control 5°C 2 SL, tratamiento 1-MCP 6,6 SL, Control 0°C 4 SL.

<sup>3</sup>Días en SL de los frutos, control 5°C 2 SL, tratamiento 1-MCP 4 SL, Control 0°C 4 SL.



## 1.2. Color de piel.

Se realizó la medición del color externo de paltas cv. Hass utilizando una escala no paramétrica con valores arbitrarios (Figura 5).

A cosecha los frutos de todas las cosechas mostraron un color verde de piel. Sin embargo, luego del almacenamiento refrigerado se observó una situación distinta, mostrando los frutos aplicados con 1-MCP de todas las cosechas un color verde de la piel, diferente a lo observado en los demás tratamientos donde el 50% del color de piel de los frutos es negro (Tablas 7, 8 y 9)



Figura 5. Escala de color para paltas var Hass.

**Tabla 7.** Color de piel en paltas cv. Hass correspondiente a la primera cosecha.

Temperatura (°C)	Tratamiento	Salida de frío		"Shelf life"	
		30 días <sup>1</sup>	40 días <sup>1</sup>	30 días <sup>1</sup>	40 días <sup>1</sup>
5	Control	1,0 a	2,1 a	3,3 b	3,0 b
	1-MCP	1,0 a	1,0 b	4,1 a	4,0 a
0	Control	1,0 a	2,0 a	2,7 c	2,9 b

<sup>1</sup>Color externo de paltas var Hass donde los valores corresponden a los promedios y letras diferentes en las columnas representa diferencia significativa utilizando un análisis Anova con LSD  $p < 0,05$

**Tabla 8.** Color de piel en paltas cv. Hass correspondiente a la segunda cosecha.

Temperatura (°C)	Tratamiento	Salida de frío		"Shelf life"	
		30 días <sup>1</sup>	40 días <sup>1</sup>	30 días <sup>1</sup>	40 días <sup>1</sup>
5	Control	2,0 b	2,0 b	4,0 b	4,4 a
	1-MCP	2,0 b	2,0 b	4,6 a	3,9 b
0	Control	2,6 a	3,1 a	4,0 b	4,0 b

<sup>1</sup>Color externo de paltas var Hass donde los valores corresponden a los promedios y letras diferentes en las columnas representa diferencia significativa utilizando un análisis Anova con LSD  $p < 0,05$

**Tabla 9.** Color de piel en paltas cv. Hass correspondiente a la tercera cosecha.

Temperatura (°C)	Tratamiento	Salida de frío		"Shelf life"	
		30 días <sup>1</sup>	40 días <sup>1</sup>	30 días <sup>1</sup>	40 días <sup>1</sup>
5	Control	2,3 b	1,9 b	2,7 c	3,1 b
	1-MCP	1,9 c	1,7 b	4,7 a	3,9 a
0	Control	3,4 a	3,4 a	3,5 b	4,0 a

<sup>1</sup>Color externo de paltas var Hass donde los valores corresponden a los promedios y letras diferentes en las columnas representa diferencia significativa utilizando un análisis Anova con LSD,  $p < 0,05$ .

### 1.3. Análisis del contenido de aceite en frutos de *Persea americana*.

La evaluación de este parámetro se realizó por medio de la correlación inversa que existe entre el contenido de humedad y el porcentaje de aceite, a través de la medición de la materia seca de los frutos cuya metodología esta explicada en materiales y métodos. Se observó que el contenido de aceite aumentaba en frutos cosechados tardíamente (Tabla 10).

**Tabla 10.** Porcentaje del contenido de aceite mediante materia seca de paltas cv. Hass correspondiente a cosecha.

Cosecha	Fecha	Promedio <sup>1,2</sup>	DS <sup>3</sup>
I	30/10/2009	9,7 a	0,8
II	04/02/2010	12,2 b	0,4
III	18/03/2010	13,1 b	1,1

<sup>1</sup>Valores corresponden a los promedios de las muestras en porcentaje (%), (n = 6).

<sup>2</sup>Letras diferentes en la columna representa diferencia significativa utilizando un análisis Anova con LSD,  $p < 0,05$ .

<sup>3</sup>Valores corresponden a la desviación estándar (DS).

#### 1.4. Determinación de desórdenes fisiológicos.

Los desórdenes fisiológicos corresponden a una alteración de los tejidos del fruto, los cuales aparecen principalmente en respuesta a un ambiente adverso, especialmente de temperatura o composición atmosférica. Los desórdenes fisiológicos estudiados en esta Tesis corresponden a:

##### 1.4.1. *Pardeamiento de pulpa.*

La incidencia de este problema fue mayor en los frutos provenientes de la segunda y tercera cosecha, pero principalmente aquellos que fueron almacenados a 0°C con la idea de inducirles daño por frío, observándose un gran porcentaje de daño luego de un período de almacenamiento a 20°C, los cuales son necesarios para alcanzar la madurez de consumo, en general los frutos aplicados con 1-MCP mostraron una menor incidencia del problema. Este desorden es caracterizado por un cambio de color en el área de la pulpa el cual toma una coloración gris en un daño leve y negro en casos severos. La medición de este desorden fisiológico para paltas cv. Hass se efectuó en el momento en que los frutos alcanzaron la madurez de consumo después de haber estado almacenados 30 y 40 días en frío (5°C y 0°C), se utilizó una escala arbitraria de daño de rango 1 a 5 (Figura 6 A). Se puede observar en la figura 6 el porcentaje de frutos que presentaron pardeamiento de pulpa según la intensidad del daño.

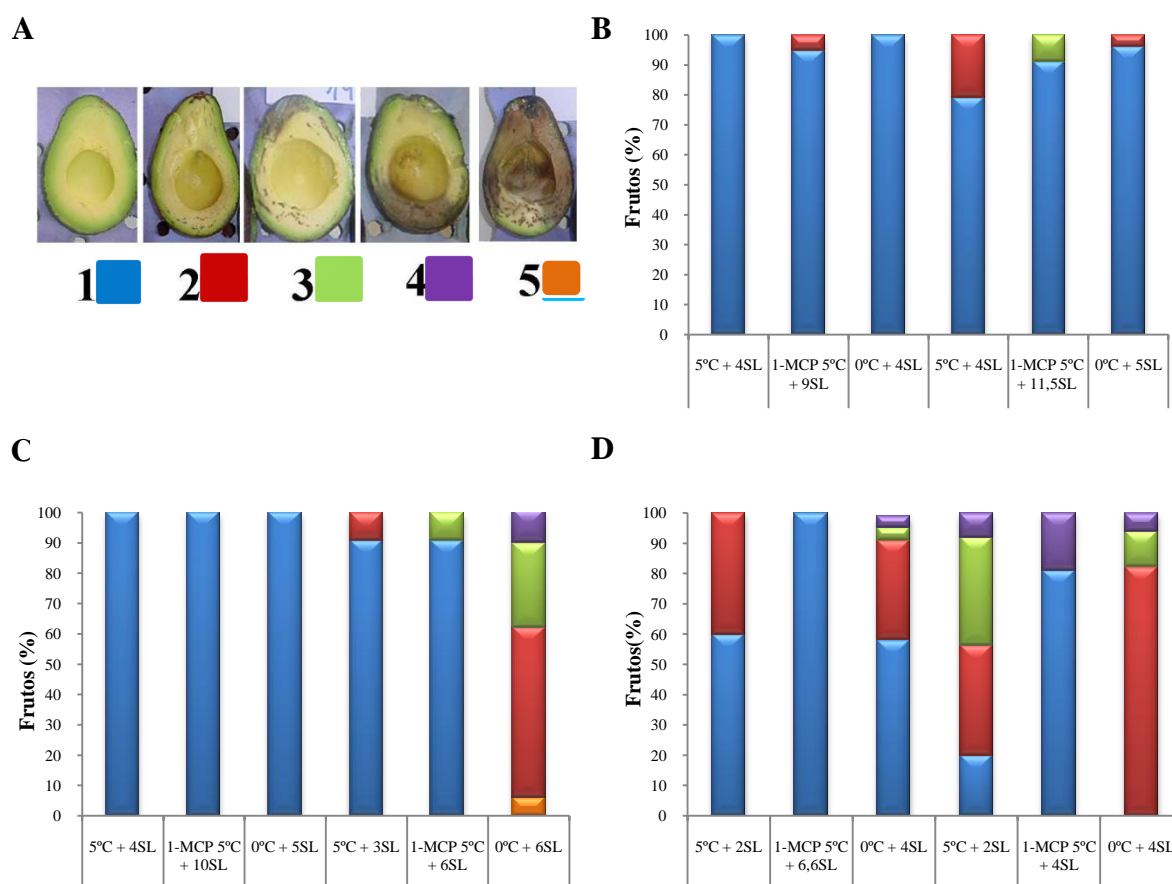


Figura 6. **Incidenca de pardeamiento de pulpa (%) en frutos luego de alcanzar la madurez de consumo (almacenados por 30 y 40 días en frío)**. Porcentaje de frutos con pardeamiento de pulpa evaluados en el momento que alcanzaron madurez de consumo (SL) después del almacenamiento en frío (5°C y 0°C) y tratados con 1-MCP. **A**, Escala no paramétrica de daño para pardeamiento de pulpa de rango de incidencia de 1 a 5, donde uno corresponde a frutos sin daño. **B**, Frutos correspondiente a la primera cosecha evaluados en el momento que alcanzaron madurez de consumo, se evaluó frutos almacenados a 5°C con y sin tratamiento con 1-MCP y frutos almacenado a 0°C. **C**, Frutos correspondientes a la segunda cosecha evaluada en el momento que alcanzaron madurez de consumo, se evaluó frutos almacenados a 5°C con y sin tratamiento con 1-MCP y frutos almacenado a 0°C. **D**, Frutos correspondiente a la tercera cosecha evaluados en el momento que alcanzaron madurez de consumo, se evaluó frutos almacenados a 5°C con y sin tratamiento con 1-MCP y frutos almacenado a 0°C. 25 frutos fueron utilizados para el análisis de pardeamiento de pulpa para cada tratamiento (5°C, 0°C y 5°C+1-MCP).

#### 1.4.2. Pardeamiento vascular.

Los frutos no presentaron gran incidencia de este desorden en esta temporada en comparación con los frutos correspondiente a la primera temporada (datos no mostrados), independiente del período de cosecha o tipo de tratamiento. Este desorden se caracteriza por un oscurecimiento (verde claro amarillento a pardo claro/negro) de los haces vasculares los cuales se ubican longitudinalmente a través del fruto, se presentan principalmente en la zona basal y distal del fruto. La medición de este desorden fisiológico para paltas cv. Hass se

efectuó en el momento que en que los frutos alcanzaron la madurez de consumo después de 30 y 40 días almacenados en frío (5 y 0°C). La medición fue realizada utilizando una escala arbitraria de daño de rango 1 a 5 (Figura 7 A). En la figura 7 se puede apreciar el porcentaje de frutos que presentaron pardeamiento vascular según la intensidad del daño.

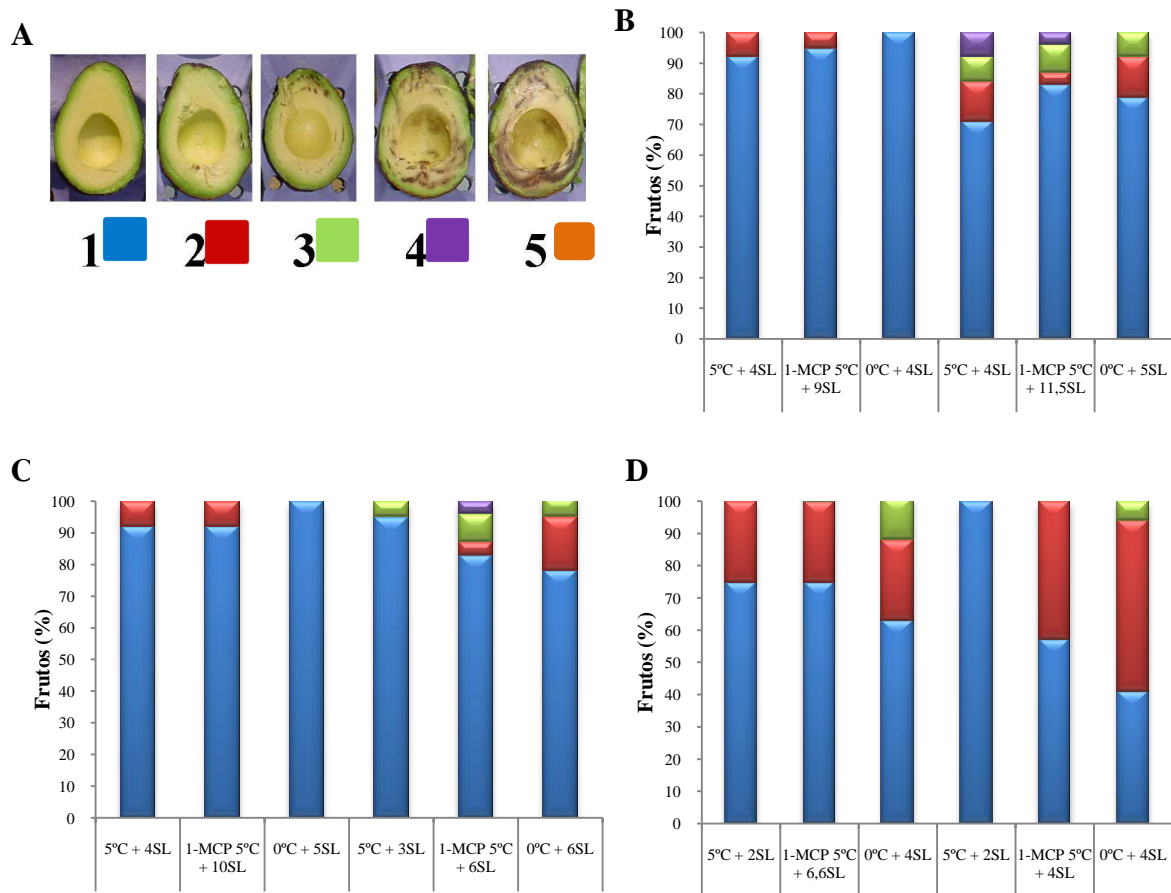


Figura 7. Incidencia de pardeamiento vascular (%) en frutos luego de alcanzar la madurez de consumo después de estar almacenados por 30 y 40 días en frío. Porcentaje de frutos con pardeamiento de pulpa evaluados en el momento que alcanzaron madurez de consumo (SL) después del almacenamiento en frío (5°C y 0°C) y tratados con 1-MCP. **A** Escala no paramétrica de daño para pardeamiento vascular de rango de incidencia de 1 a 5, donde 1 es fruto sin daño. **B** Frutos correspondiente a la primera cosecha evaluados en el momento que alcanzaron madurez de consumo, se evaluó frutos almacenados a 5°C con y sin tratamiento con 1-MCP y frutos almacenado a 0°C. **C** Frutos correspondiente a la segunda cosecha evaluados en el momento que alcanzaron madurez de consumo, se evaluó frutos almacenados a 5°C con y sin tratamiento con 1-MCP y frutos almacenado a 0°C. **D** Frutos correspondiente a la tercera cosecha evaluados en el momento que alcanzaron madurez de consumo, se evaluó frutos almacenados a 5°C con y sin tratamiento con 1-MCP y frutos almacenado a 0°C. 25 frutos fueron utilizados para el análisis de pardeamiento vascular para cada tratamiento (5°C, 0°C y 5°C+1-MCP).

## 2. Identificación y Caracterización molecular de *Acetil CoA Carboxilasa subunidad biotina carboxilasa (BC) de Persea americana*.

### 2.1. Obtención del transcrito de largo completo de la subunidad *biotina carboxilasa* de la enzima *Acetil-CoA Caboxilasa (PamACCCase BC)*

Se obtuvo y completó la secuencia de mRNA de la subunidad BC (biotina carboxilasa) de *Acetil coa Carboxilasa* mediante RACE-PCR a partir de un EST (Expressed sequence tag) de 713bp el cual fue obtenido de una librería de cDNA de *Persea americana* (acceso a genbank: FD508677), se logró obtener el cDNA completo utilizando los partidores de la tabla 11.

**Tabla 11.** Partidores utilizados para la generación del cDNA completo de *ACCCase BC* de *Persea americana*.

Secuencias de primer utilizadas para RACE-PCR				
Gen	Secuencias de oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño del producto(bp) <sup>1</sup>	Localización en el cDNA	Temperatura de Anneling(°C)
<i>PamACCCase/BC</i>	R: CCAGAGGGCACGTATGCAGTT	934	1401	64
<i>PamACCCase/BC(2)</i>	R: TTTCCTCGCAGTAGCTTATC	700	679	64

<sup>1</sup>Tamaño de los amplicones obtenidos del Nested-PCR  
R, oligonucleótido reverse

### 2.2. Análisis de secuencia nucleotídica y aminoacídica de *PamACCCase BC*.

La secuencia nucleotídica de *PamACCCase BC* obtenida por RACE (*Rapid amplification of 5'-3' cDNA end*)-PCR corresponde a un producto de 1803 bp el cual incluye parte del 5' y 3' UTR (*untranslation region*) del gen. Los UTR fueron analizados utilizando el servidor UTRdb (<http://utrdb.ba.itb.cnr.it/getutr/5ATHR017101>) el cual no arrojó ningún resultado para nuestro gen. Respecto al marco de lectura, este fue predicho utilizando el servidor ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) el cual identificó un marco de lectura de 1584 bp que codifica para una secuencia aminoacídica de 527 aminoácidos. Esta proteína putativa tiene un punto isoeléctrico teórico de 6,12 y un peso molecular estimado de 57,4 KD. Para el análisis de la señal de tránsito se utilizó el servidor TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Tabla 12), el cual predijo una señal de tránsito hacia el cloroplasto con un posible sitio de corte en el aminoácido 43 de la secuencia aminoacídica (Figura 8).

**Tabla 12.** Localización subcelular de *PamACC*Case BC usando el programa TargetP.

Localización subcelular de PamACCCase BC predicha por el programa TargetP						
Proteína	Len	cTP	mTP	Localización	RC	TPlen
<i>PamACC</i> Case BC	527	0,409	0,090	Cloroplasto	5	43

Len, largo de la secuencia; cTP, péptido de transito al cloroplasto; mTP, péptido de transito mitocondrial; RC, coeficiente de confianza de 1 a 5 donde 1 indica una predicción del 99.9%; Tplen; largo del péptido de transito

```

1   TTTTCCCTGAAAAGTTCCACAAAATCCCACATTCTCTCTCCCTCTCTCCTTCCAGGCGTTGCTCTTGCTCTTTGGCGGTTTCAATCATTGCAGTT 102
103 TGTTTTGCACAGCTGAAATCCAAACTTTCTCGCTTTAAAGTTGGTTTCTTTTGAGCAGCATGGACGCGCTTATTCATCCACATCGATCGCAAGCCCTCT 201
1   M D A V I A S T S I C K P P 14
202 GGTTCGCTCGTGGGCAAGCCAGAGGAATAAAGAGCTCACAGTGCAGCTTTATGATAGGAAATGGGGTGGATTTCTTAGAAAATAGAGCTGCA 294
15  G L L V G Q A R G I K S S Q C S F M I G N G V D F L R N R A A 45
295 TATTTAAGCAAGAAGCTCGGGGAGCAGCTTAATGCAACCTGCCCGATGAGAAGATTCTTGTGCAAATAGAGGGGAGATTGCTGTACGTGTG 387
46  Y L S K K L G G A L N A T C R D E K I L V A N R G E I A V R V 76
388 ATAAGAACTGCTCATGAGATGGGGATACCATGTGTTGCCGCTTACTCAACAATAGATCAGGATGCAGCTTCACGTGCGGCTGGCAGATGAAGCT 480
77  I R T A H E M G I P C V A A Y S T I D Q D A L H V R L A D E A 107
481 GTTTCATTTGGGAAGCACAAGTAGTCAGTCGATTTTGTTCATTCCAAATGTTCTGTCTGCTGCCGTGAGCCGTGAATGTACCATGTTGCAT 573
108 V C I G E A P S S Q S Y L F I P N V L S A A V S R E C T M L H 138
574 CCTGGATATGGTTTCCCTTGCTGAGAATGCTACTTTTGTGATATGTGCAAAGAGCATGGTATCAATTTCAATGGGCCCAATCCTGGTAGCATC 666
139 P G Y G F L A E N A T F V D M C K E H G I N F I G P N P G S I 169
667 CGCGTTATGGTGATAAAGCTACTGCGAGGGGAAACAATGAAAAAGCTGGTGTCCGACTGTACCCGGAAGTGAAGGGTTGTACAGAGCACA 759
170 R V M G D K A T A R E T M K K A G V P T V P G S E G L L Q S T 200
760 GAAGAGGCTATCAAGCTAGCTCATGAGATTGGTTTCCAGTGTATGATCAAGGCAACTGCTGGTGGTGGTGGACGTGGGATGCGTCTAGCTAAT 852
201 E E A I K L A H E I G F P V M I K A T A G G G G R G M R L A N 231
853 GAACCTGATGAGTTTGTGAAGTTGTGACGCAAGCAAGAGTGAAGGCTGCAGCTGCATTTGGGAATGAGGAGTTATTTGGAAAAGTACATA 945
232 E P D E F V K L L Q Q A K S E A A A A F G N D G V Y L E K Y I 262
946 AAAAAACCAAGGCACATAGAGTTTCCAGGTTCTCGCAGATAAGTATGGGAACGTTGTTCACTTTGGAGAGCGTGATTGCAGCATTACGCGAAG 1038
263 K N P R H I E F Q V L A D K Y G N V V H F G E R D C S I Q R R 293
1039 AACCAGAAGCTCCTGGAAGAAGCTCCATCTCCTGCATTGACCCAGAATTGCGTAAAGCTATGGGTGACGCGAGCTGTAGCAGCTGCTGCATCT 1131
294 N Q K L L E E A P S P A L T P E L R K A M G D A A V A A A A S 324
1132 ATCGGTACATCGGTGTGGCACAGTTGAATTTCTATTGGATGAAAGGGGTTCTTCTACTTCATGGAATGAATACTAGGATCCAGGTGGAG 1224
325 I G Y I G V G T V E F L L D E R G S F Y F M E M N T R I Q V E 355
1225 CACCCGTGACGGAAATGATTTCTTCTACTGATTTGATTGAGGAACAAATTCGTGTAGCACTTGGGGATAGACTTGAGTACAAACAGGAAGAT 1317
356 H P V T E M I S S T D L I E E Q I R V A L G D R L E Y K Q E D 386
1318 ATTTGACTCAGAGGACATTCATTTGAATGCCGGATCAATGCAGAAGTGTCTTCAAAGGATTCGCCCTGGTCTGGGAGGATAACTGCATAC 1410
387 I V L R G H S I E C R I N A E D A F K G F R P G P G R I T A Y 417
1411 GTGCCCTCTGGTGGCCCATTTGTGAGAATGGACAGCCATGTTTATCCAGATTATGTGGTTCTCCAGCTACGACTCTACTAGGAAAGCTC 1503
418 V P S G G P F V R M D S H V Y P D Y V V P P S Y D S L L G K L 448
1504 ATTTGTTGGGACCAACAGAGAGAAAGCAATTGAACGCATGAAGAGGCTCTTAATGACACTGTTATAACCGGAATTCACCAACACCATTTGAA 1596
449 I V W A P T R E K A I E R M K R A L N D T V I T G I P T T I E 479
1597 TACCATAAACTACTACTTGACATCGAGGACTTCAGAACTGGTAAATTTGATACTGCATTTCACCAAAGCATGAGAAGGAATTAGCTGAGCCC 1689
480 Y H K L I L D I E D F R T G K I D T A F I P K H E K E L A E P 510
1690 CAGAAAATGGTGTCTATCAAGCTCGGCAAAAAGAGCTAGCTGGCACAAGTGTGTAGACAAACTGTTTATGCTGATTTCTGACTGCAATGAATG 1782
511 Q K M V L S T S A K E L A G T S V * 527
1783 TTTGTAGGCATTTTCTCTT 1803

```

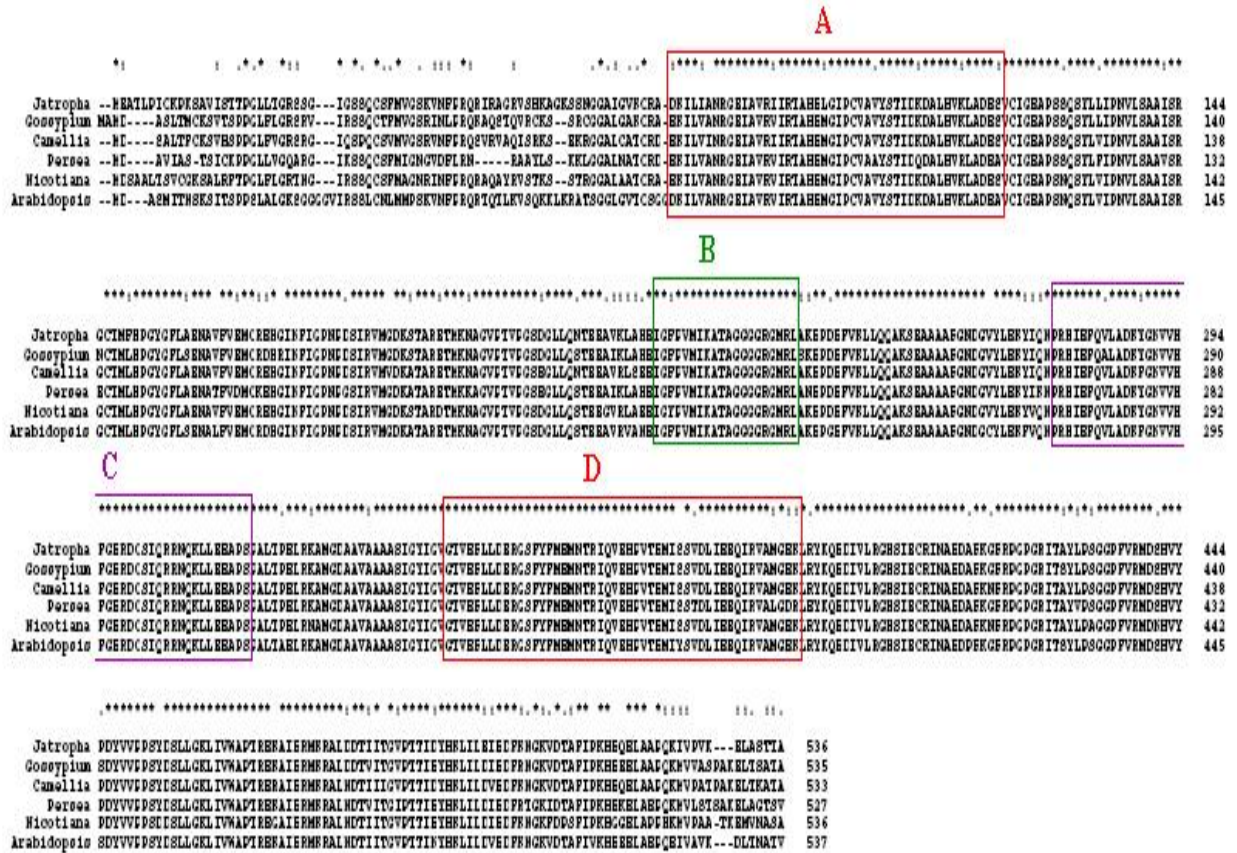
**Figura 8. Secuencia del transcrito de largo completo y la aminoacídica putativa de *acetil-Coa carboxilasa biotina carboxilasa*.** El codón de la traducción esta bajo línea y el de término de la traducción esta bajo línea y asterisco. La flecha entre los residuos aminoacídicos arginina (R) y alanina (A) indica un sitio de clivaje putativo del péptido de transito predicho mediante TargetP. Las letras sobre la línea de color rojo en los extremos de la secuencia nucleotídica representan parte de los 5' y 3' UTR del gen.

### 2.3. Análisis de motivos y dominios estructurales de PamACCcase BC

El análisis de motivos se realizó utilizando el algoritmo de Clustal W mediante el programa Clustalx1.83, el cual nos permitió analizar la secuencia aminoacídica de PamACCcase BC a través de un alineamiento múltiple con 5 secuencias ortólogas de diferentes especies de plantas, las cuales fueron previamente seleccionados de un análisis de BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Luego de este análisis se eligió secuencias que poseían un alto *score*, un *E-value* de 0 y un porcentaje de identidad con la secuencias de algodón (*Gossypium hirsutu*), 84%; de *Camellia oleífera*, 85%; de *Jatropha curcas*, 83%; de *Arabidopsis thaliana*, 80% y con la secuencia de tabaco (*Nicotiana tabacum*) un 82%. Utilizando la base de datos de InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) y de secuencias ortólogas ya caracterizadas para ACCcase BC se logró identificar 4 dominios estructurales de PamACCcase BC, BC-1 (residuos 62-107), BC-2 (residuos 265-303), sitio de unión de ATP (residuos 210-229) y biotina carboxilación (residuos 331-378). Adicional al análisis anterior se estudiaron las diferencias de las secuencias ortólogas con PamACCcase BC mediante la confección de un árbol filogenético utilizando el programa MEGA 4.1 (<http://www.megasoftware.net/mega41.html>) (Figura 9).



D)



II)

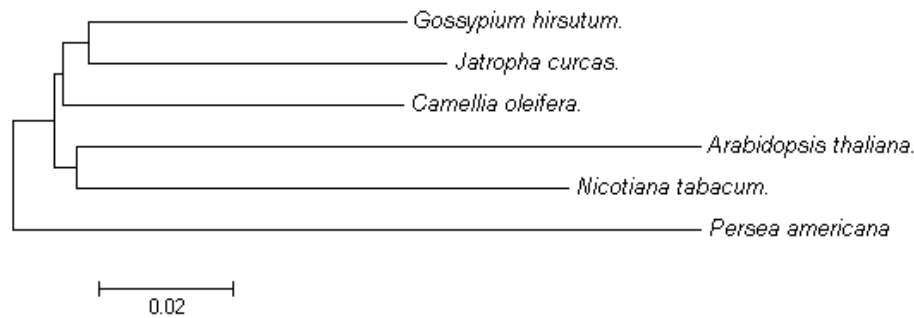


Figura 9. Análisis de motivos y dominios estructurales de *PamACCase BC*. Panel I, Alineamiento múltiple de 5 secuencias ortólogas de *ACCase BC*: *Jatropha curcas* (acceso: ACR61637), *Gossypium hirsutum* (acceso: ABP98813), *Camellia oleifera* (acceso: ACS14663), *Persea americana*, *Nicotiana tabacum* (acceso: AAC41659) y *Arabidopsis thaliana* (acceso: AAC09008), utilizando el programa clustalx1.83. Aminoácidos idénticos son representados por un asterisco (\*). El número en el margen derecho indica la posición del último aminoácido en la línea. Rectángulos de colores con letras representan a los dominios estructurales de *ACCase BC*: A, BC-1; B, sitio de unión de ATP; C, BC-2 y D, biotina carboxilación. Panel II, Análisis filogenético de las secuencias ortólogas de *PamACCase BC* utilizando el software MEGA 4.1, donde las líneas significan la cercanía que existen entre las secuencias.

### 3. Caracterización molecular de *Acetil CoA Carboxilasa* subunidad Proteína transportadora de *Carboxil Biotina (BCCP)* de *Persea americana*.

#### 3.1. Obtención del transcrito de largo completo de la subunidad proteína transportadora de carboxil biotina de la enzima Acetil CoA Carboxilasa (PamACCCase BCCP)

Se completó la secuencia de mRNA de la subunidad BCCP (proteína transportadora de carboxil biotina) de acetil coa carboxilasa mediante RACE-PCR a partir de un EST (Expressed sequence tag) de 463bp el cual fue obtenido de una librería de cDNA de *Persea americana* (acceso a genbank: CV001974), se logró obtener el cDNA completo utilizando los primarios de la tabla 13.

**Tabla 13.** Primer utilizados para la generación del cDNA completo de *ACCCase BCCP* de *Persea americana*.

Secuencias de primer utilizadas para RACE-PCR				
Gen	Secuencias de oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño del producto(bp) <sup>1</sup>	Localización en el cDNA	Temperatura de Anneling(°C)
<i>PamACCCase/BCCP</i>	F: GGCAGGAACATTCTATCGGAGC	468	702	66
<i>PamACCCase/BCCP(2)</i>	R: TCAATGATGCACAACACTTGTC	329	775	64
<i>PamACCCase/BCCP(4)</i>	R: ATAGCTGCTGGAGGGGAGGGT	160	546	66
<i>PamACCCase/BCCP(6)</i>	R: ATGGTTCATTGGCATCCTTGCT	356	333	64

<sup>1</sup>Tamaño de los amplicones obtenidos del Nested-PCR  
F, oligonucleotido forward; R, oligonucleotido reverse

#### 3.2. Análisis de secuencia nucleotídica y aminoacídica de *PamACCCase BCCP*.

La secuencia nucleotídica de ACCCase BC obtenida por RACE -PCR corresponde a un producto de 1.170 bp el cual incluye parte del 5' y 3' UTR (*untranslation region*) del gen. Los UTR fueron analizados utilizando el servidor UTRdb (<http://utrdb.ba.itb.cnr.it/getutr/5ATHR017101>) el cual no arrojó ningún resultado para nuestro gen. Respecto al marco de lectura, este fue predicho utilizando el servidor ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) el cual identificó un marco de lectura de 846 bp que codifica para una secuencia aminoacídica de 281 aminoácidos. Esta proteína putativa tiene un punto isoeléctrico de 8,36 y un peso molecular estimado de 29,9KD. Para el análisis de la señal de destino se utilizó el servidor TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) y ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) (Tabla 14), los cuales predijeron una señal hacia el cloroplasto con un posible sitio de corte en el aminoácido 60 de la secuencia aminoacídica (Figura 10).

**Tabla 14.** Localización subcelular de *PamACCcase BCCP* usando el programa TargetP.

Localización subcelular de PamACCcase BCCP predicha por el programa TargetP						
Proteína	Len	cTP	mTP	Localización	RC	TPlen
<i>PamACCcase BCCP</i>	281	0,987	0,050	Cloroplasto	1	60

Len, largo de la secuencia; cTP, péptido de transito al cloroplasto; mTP, péptido de transito mitocondrial; RC, coeficiente de confianza de 1 a 5 donde 1 indica una predicción del 99.9%; Tplen; largo del péptido de transito

```

1  GCACCTTACCCAAACACTCACAGACCATCCCAACACACACACACATAGATTGAGAGAGAGAGAGATGGCATCTTCTTTTCCAGCAGCCTCGGCTTCT 103
1  M A S S F P A A S A S 11
104 GTTCCGACCACCCGCCGAATCTCCTCCTTCTAAGCGCCACCACTTACATCACTCCAAGCTCTCCTTTTCGTCTCTTCCAATCGAACTTCAT 199
12 V P T T A R I S S S S S K R H H L H H S K L S F R L S S K S K L H 43
200 TTCTCAACCAAGGCTTCAAGGATTAATTTGGAATCGTTTCGGTTGTTACGAGAGCCCACTGAATGAGGTCTCCATTGATGGATCTTCAAATGCTTCC 295
44 F S T K A S R I N W N R S V V T R A Q L N E V S I D G S S N A S 75
296 ACATCTCCCTCAAAAACCTCTGAAGCACTGCATTGGAAGACAAGGATGCCAATGAACCATCTTTGGAGGCACCAGTCTCGGAGGAATATATCTCA 391
76 T S P S K N S E A P A L E D K D A N E P S L E A P V S E E Y I S 107
392 GAATTTATAAATCAAGTTGCAAGCCTTGTAAAGCTAGTTGACTCGAGAGATATTGTCGAGCTGCAGTTGAARCAACATAACTGTGAAGTGATAATC 487
108 E F I N Q V A S L V K L V D S R D I V E L Q L K Q H N C E V I I 139
488 CGTAAAAAGAGGCTTGGCTCAACCACCAGGACAGCTCCTGTAGTCATGATGCATTCACCTCCCTCCAGCAGTATGCCATCTCATTATCCA 583
140 R K K E A L A Q P P G P A P V V M M H S P S P P A A M P S H Y P 171
584 CCTCCACAACCTGCCACTGCACCAGCACCCGCTAGCCCTGCCCTTCAACCTCAGCTCCTACAGCCCTAAGTGCAGCCAAGTCTCCAAAGTCATCA 679
172 P P Q P A T A P A P A S P A P S T S A P T A L T A A K S P K S S 203
680 TTACCACCTCTGAAATGCCCATGGCAGGAACATCTATAGGAGCACAGGACCTGGTGAACCTCCATTTGTGAAGTTGGAGATAAAGTGAAGAAA 775
204 L P P L K C P M A G T F Y R S T G P G E P P F V K V G D K V K K 235
776 GGACAAGTGTGTGCATCATTGAAGCTATGAAATTGATGAATGAAATTGAAGCTGATCAATCAGGAACATATAGTAGAGATCCTTGCTGAGGATGCC 871
236 G Q V L C I I E A M K L M N E I E A D Q S G T I V E I L A E D A 267
872 AAGCCAGTTAGTGTGACTCCTTGTGTTGATCGAACCCTGAAGCAAGTCTCTACACTCAACTAGGTGTCTGTAACCTAGAGGTTGTTGTTGTTAAT 972
268 K P V S V D T P L F V I E P * 281
973 TTTTGGCCAGTCTTTCTTTGTGATGGATGATTTTGGATGACCGAGATATGAAATAATGTTGAGCCCTTTTCACTGACCCACTAGATTTGAGACTGATTTAATC 1078
1079 TTTTCTATCATATATTTGTGAGGATAATGTCACATTTTCGTTGABAGTATTATGGCTTTTTTGTACTCABAAAAAABAAAAAABAAAAA 1180

```

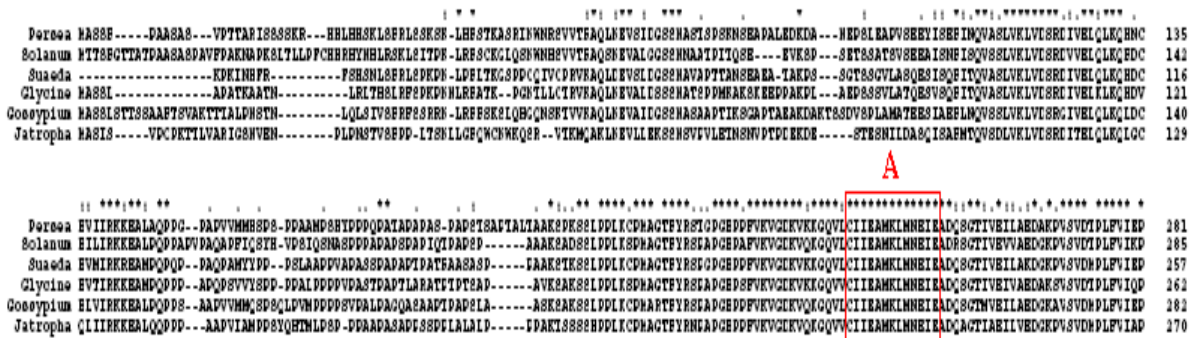
Figura 10. Secuencia del transcrito de largo completo y la aminoacídica putativa de *Acetil-coa Carboxilasa BCCP* de *Persea americana*. El codon de la traducción esta bajo línea y el de término de la traducción esta bajo línea y asterisco. La flecha entre los residuos aminoacídicos arginina (R) y alanina (A) indica un sitio de clivaje putativo del péptido de destino predicho mediante TargetP y ChloroP. Las letras sobre la línea de color rojo en los extremos de la secuencia nucleotídica representan parte de los 5' y 3' UTR del gen.

### 3.3. Análisis de motivos y dominios estructurales de *PamACCcase BCCP*

Para el análisis de motivos y dominios de *PamACCcase BCCP* se seleccionaron 5 secuencias ortólogas de *ACCcase BCCP* las cuales fueron seleccionados mediante un análisis de BlasP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Luego de este análisis se eligió secuencias que poseían un *score* alto, *E-value* bajo y un porcentaje de identidad con la secuencia de: algodón (*Gossypium hirsutum*), 64%; de tomate (*Solanum lycopersicum*), 59%; de *Suaeda salsa*, 64%; de soja (*Glycine max*); 65% y con la secuencia de *Jatropha curcas*, 53%. Posterior a este análisis se realizó un alineamiento múltiple de las 5 secuencias ortólogas utilizando el programa clustalx1.83 en el cual se utilizó el algoritmo ClustalW observándose una gran similitud entre las secuencias en el extremo C-terminal. Mediante el análisis realizado en la

base de datos de InterProScan (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y de secuencias ortólogas caracterizadas para *ACCase BCCP* se logró identificar el motivo biotilación CHEAMKLMNEIE ubicado entre los residuos 240-252 del extremo C-terminal, donde el aminoácido lisina (L) corresponde al sitio de unión del cofactor biotina. Adicional al análisis anterior se estudió las diferencias de las secuencias ortólogas con *PamBCCP* mediante la confección de un árbol filogenético realizado con el programa MEGA 4.1 (Figura 11).

I)



II)

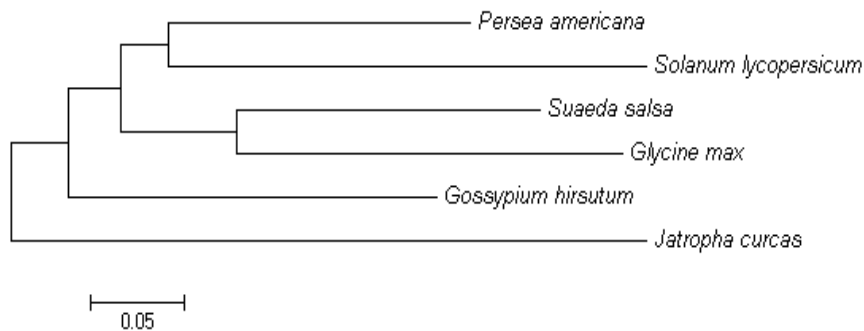


Figura 11. Análisis de motivos y dominios estructurales de *PamACCase BCCP*. Panel I, Alineamiento múltiple de 5 secuencias ortólogas de *ACCase BCCP*: *Solanum lycopersicum* (acceso: AA066472), *Suaeda salsa* (acceso: ACN85391), *Glycine max* (acceso: AAG44776), *Gossypium hirsutum* (acceso: ABU41519), *Jatropha curcas* (ACT33948), utilizando el programa clustalx1.83. Aminoácidos idénticos son representados por un asterisco (\*). El número en el margen derecho indica la posición del último aminoácido en la línea. Rectángulo de color rojo con letra A representan al motivo biotilación. Panel II, Análisis filogenético de las secuencias ortólogas de *ACCase BCCP* utilizando el software MEGA 4.1, donde las líneas significan la cercanía que existen entre las secuencias.

#### 4. Caracterización de *PamACCcase* y *SAD* en diferentes tejidos de *Persea americana*.

##### 4.1. Análisis de expresión mediante PCR de *ACCcase BC*, *BCCP*, *SAD* y *Rubisco* en diferentes tejidos de *Persea americana*

Mediante PCR se logró identificar los tejidos en los cuales se expresan *PamACCcase BC*, *PamACCcase BCCP* y *PamSAD*. Para la detección se utilizó el número de ciclo mínimo de amplificación para cada gen. Respecto a la reacción de PCR se utilizaron cDNAs provenientes de diferentes tejidos de *Persea americana*, tales como: hoja, botón, flor, fruto inmaduro y fruto maduro (Figura 12). Como se observa en la figura 12, *PamACCcase BC* se expreso en todos los tejidos analizados a diferencia de *PamACCcase BCCP* el cual se expreso en botón, flor y principalmente en fruto maduro. Respecto a *PamSad*, este se expreso solamente en fruto (inmaduro-maduro). La importancia de estudiar la expresión de *PamACCcase* en diferentes tejidos de *Persea americana* es que el pardeamiento interno ocurre en los frutos maduros (madurez de consumo).

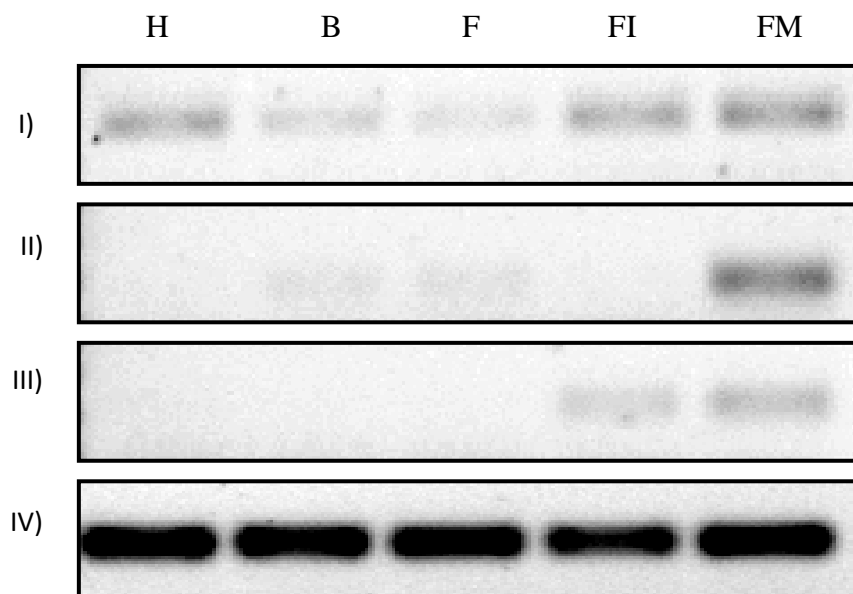


Figura 12. **Expresión de *ACCcase BC*, *BCCP*, *Sad* y *Rubisco* en diferentes tejidos de *Persea americana*.** Para la visualización de los productos de PCR se realizo un gel de agarosa al 1% observándose los amplicones: **I**, *PamACCcase BC*, **II**, *PamACCcase BCCP*, **III**, *PamSAD* y **IV**, Gen de expresión constitutiva *PamRubisco*. Letras mayúsculas corresponde a los tejidos utilizados de *Persea americana*: H = hoja, B= botón, F=flor, FI= fruto inmaduro y FM= fruto maduro.

## 5. Estudió de expresión mediante Real-Time PCR (q-PCR) de *PamACCase BC*, *PamACCase BCCP*, *PamSAD* y *PamACO*.

### 5.1. Generación de cDNA para q-PCR

Para la generación de los cDNA se realizó la extracción de ARN de la pulpa (mesocarpio) del fruto mediante el protocolo Hot Borate el cual es explicado en materiales y métodos. La integridad de los RNA totales obtenidos se puede apreciar en la figura 13 donde se observa las subunidades ribosomales 18S y 28S. Posterior a esto se realizó la síntesis de cDNA donde se utilizó como control de reacción el gen DAP. Para ver la calidad de los cDNA se realizó un PCR para amplificar el gen DAP y actina (*PamAct*) los cuales producen un amplicón de 431bp y 289 bp, figura 14.

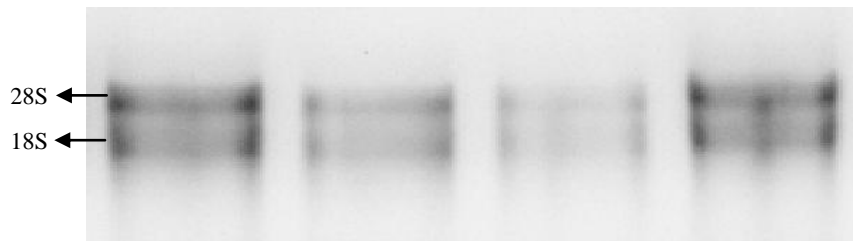


Figura 13. **Verificación de la integridad de RNA totales extraídos de *Persea americana*.** Las muestras de RNA totales obtenidas de los frutos fueron fraccionadas en un gel desnaturalante al 1% y teñidas con bromuro de etidio para su visualización. En la imagen se observan las subunidades ribosomales 18S y 28S correspondiente a cuatro muestras de RNA totales de palta var Hass.

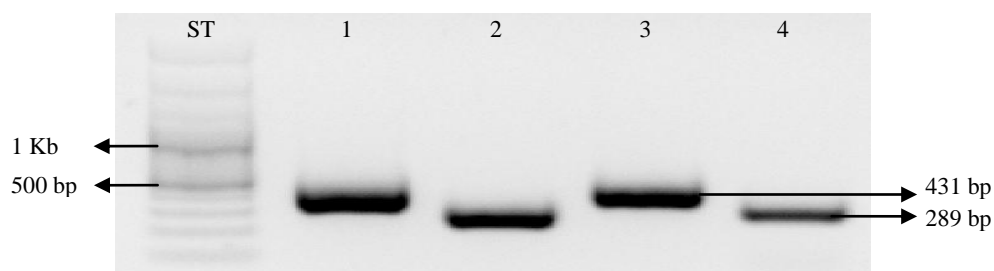


Figura 14. **Verificación de la calidad de los mRNA poly(A)+.** A partir de los mRNAs aislados de cada muestra se sintetizaron cDNAs de hebra simple, que se utilizaron como sustrato para la amplificación mediante PCR. En la imagen se muestra la amplificación por PCR de 2 cDNA de *Persea americana* utilizando partidores específicos para los genes: 1-3, DAP (431 bp); 2-4 *PamACT* (289 bp). Se fraccionaron 5 ul de cada producto en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X y fueron visualizados con bromuro de etidio. ST. Marcador de peso molecular de 100 bp.

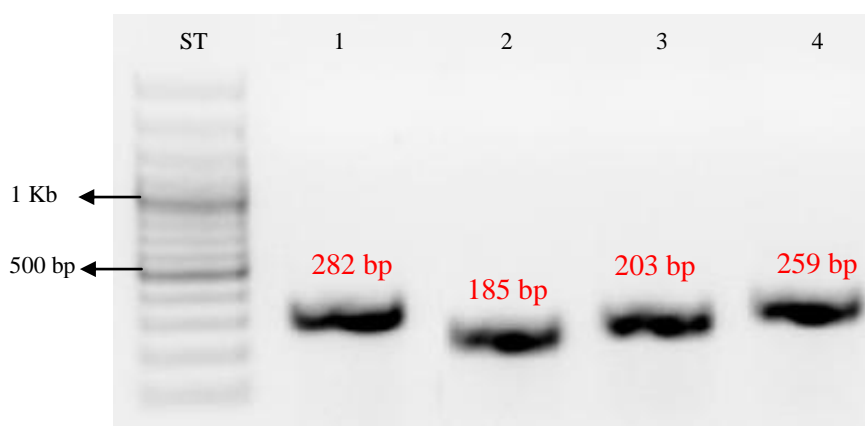
## 5.2. Primer utilizados para los análisis de expresión mediante q-PCR.

Se diseñaron partidores para los genes *PamACCcase BC*, *PamACCcase BCCP*, *PamSAD* (GenBank: AF116861), *PamACO* y *PamRubisco* (Genbank: AY337727) utilizando el programa Primer premier 5.0. En la tabla 15 se visualiza las condiciones de la reacción de q-PCR y las características de los partidores diseñados. Para verificar los primer diseñados se realizó un q-PCR de los genes *ACCcase BC*, *ACCcase BCCP*, *SAD* y *Rubisco* de *Persea americana* obteniéndose los amplicones correctos (Figura 15).

**Tabla 15.** Partidores utilizados para expresión en PCR en tiempo real.

Secuencias de primer y condiciones de PCR usados para un análisis por q-PCR					
Gen	Secuencias de oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño del producto(bp)	Localización en el cDNA	Temperatura de Anneling(°C)	Numero de ciclos de PCR
ACCcase/BCCP	F : GGCAGGAACATTCTATCGGAGC	185	702	64	20
	R: CAACACTAACTGGCTTGGCATC		865		
ACCcase/BC	F : CATCGGTGTTGGCACAGTTGAA	282	980	64	15
	R: CCAGAGGGCACGTATGCAGTT		1241		
SAD	F : GCACTTTGAGAATGGCACTATC	203	1194	64	16
	R: TTAAAGAAGACTTCCCAAAGTCA		1373		
Rub	F : GCCCATGGCATCCAAGTTGA	259	389	64	16
	R: TCCTTTGATTTCACCTGTTTCGG		625		
ACO	F : GCACAGACAGACGGAAACAGG	242	714	62	15
	R: GTAATGGGACTCAAATTAGCAGT		933		

F, oligonucleótido forward; R, oligonucleótido reverse



**Figura 15. Verificación de los partidores para *ACCcase BC*, *ACCcase BCCP*, *SAD* y *Rubisco* de *Persea americana*.** A partir de un cDNA de hebra simple de *Persea americana*, el cual se utilizó como sustrato para una amplificación por PCR en tiempo real de los genes: **1**, *PamACCcase BC*; **2**, *PamACCcase BCCP*; **3**, *PamSAD*; **4**, *PamRubisco*. Se fraccionaron 5 ul de cada producto en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X y fueron visualizados con bromuro de etidio. **ST**. Marcador de peso molecular de 100 bp.

### 5.3. Identificación de un gen de expresión constitutiva (*HouseKeeping*) para *Persea americana*.

Para poder representar los datos obtenidos de un PCR en tiempo real es necesario tener un gen que no cambie su expresión bajo ninguna condición, el cual será utilizado para la normalización de los datos. La identificación de *Rubisco* cuya expresión (figura 16 A y B) tuvo un comportamiento similar al control (Figura 16 C y D) fue importante para poder ser utilizado como gen de expresión constitutiva para la normalización de los datos. Para validar a *Rubisco* se seleccionó un grupo de frutos en los cuales se estudió la expresión del gen *PamACCase BC* cuyos datos fueron normalizados utilizando *Rubisco*, a su vez como análisis comparativo se normalizaron los mismos datos mediante un gen externo (*DAP*) el cual fue utilizado como control. Como se observa en la figura 16, las muestras que fueron normalizadas mediante *Rubisco* y *DAP*, tuvieron un perfil de expresión similar, independiente del tipo de tratamiento o época de cosecha, lo cual nos indico que *Rubisco* es posible de ser utilizado como gen de expresión constitutiva.



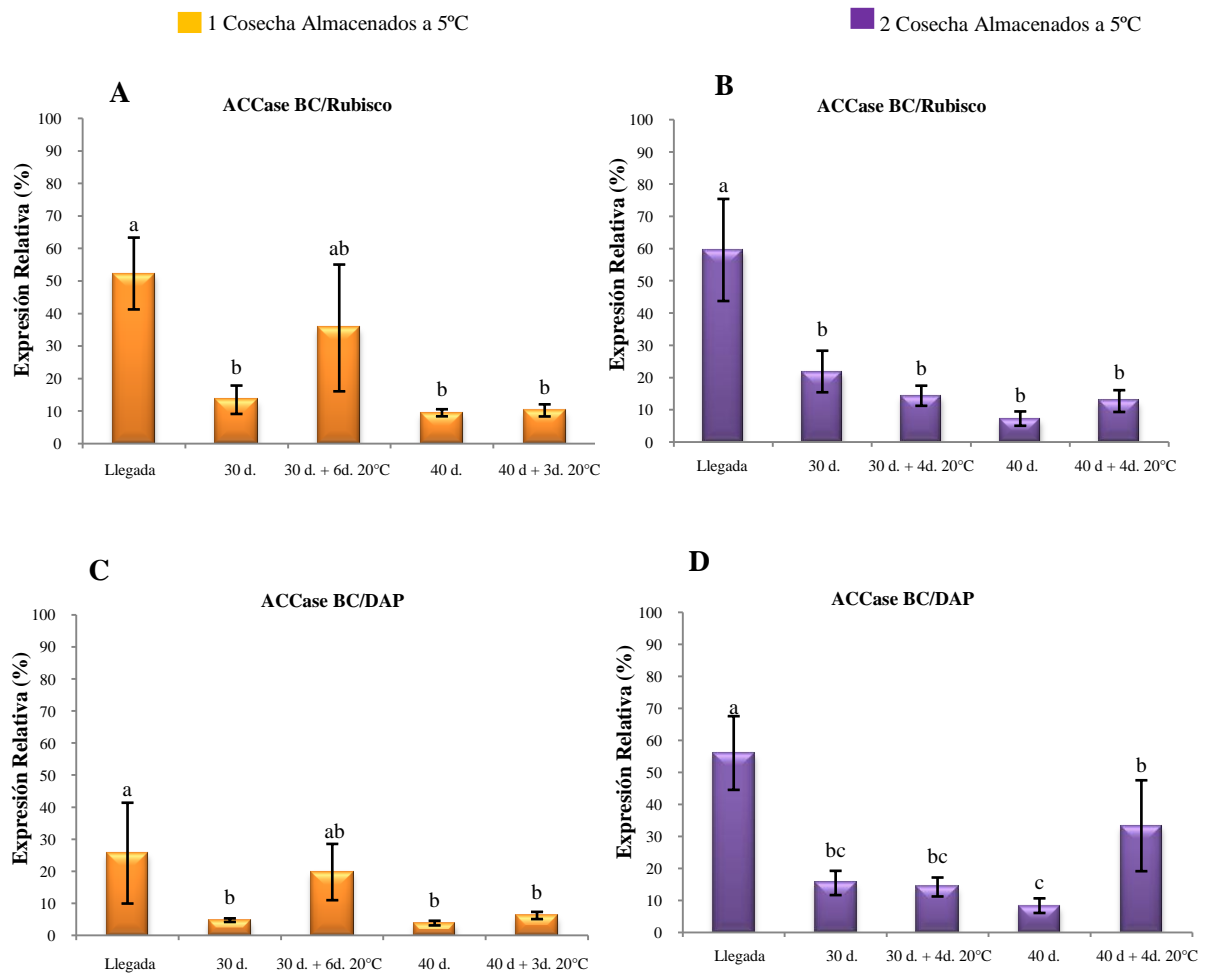


Figura 16. Estudio de expresión mediante q-PCR de muestras normalizadas con los genes *Dap* y *Rubisco*. Para la expresión relativa los genes fueron normalizados con el gen de mayor expresión. Para el análisis se utilizaron muestras de palta var Hass correspondiente a la primera y segunda cosecha de la primera temporada (2008). Se utilizaron frutos almacenados por 30 y 40 días (d) a 5°C y cuando alcanzaron madurez de consumo después de estar almacenados a 20°C. **A**, Expresión de *PamACCase BC* en muestras correspondiente a la 1<sup>ra</sup> cosecha normalizadas con *PamRubisco*. **B**, Expresión de *PamACCase BC* en muestras correspondiente a la 2<sup>da</sup> cosecha normalizadas con *PamRubisco*. **C**, Expresión de *PamACCase BC* en muestras correspondiente a la 1<sup>ra</sup> cosecha normalizadas con *DAP*. **D**, Expresión de *PamACCase BC* en muestras correspondiente a la 2<sup>da</sup> cosecha normalizadas con *DAP*. Letras diferentes en los gráficos representa diferencias significativas en las muestras mediante un análisis Anova con LSD,  $p < 0,05$ . Barras en los gráficos corresponden al error estándar (SE) de 6 muestras biológicas.

#### 5.4. Estudió de expresión de *PamACCase BC*, *Pam ACCase BCCP* y *PamSad* en frutos a cosecha.

Debido a que los frutos acumulan aceite cuando están en el árbol se decidió estudiar la expresión de *PamSAD*, *PamACCase BC* y *PamACCase BCCP* en frutos de llegada correspondiente a la primera y tercera cosecha de la 2<sup>da</sup> temporada, ya que ellos presentaron una diferencia significativa en el porcentaje de aceite (Figura 17 A). Respecto a esto último se quiso analizar si existe alguna correlación entre la variación del contenido de aceite y los genes en estudio (Figura 17) en donde se observó que *PamSAD* presento un aumento en su expresión (Figura 17 A) en frutos de cosechas tardías (3<sup>ra</sup> cosecha) caso contrario respecto a *PamACCase BCCP*, el cual presento una disminución en su expresión (Figura 17 D) en dicha cosecha. Por otro lado, *PamACCase BC* no presento diferencias significativas en su expresión (Figura 17 C) en frutos correspondientes a diferentes cosechas.

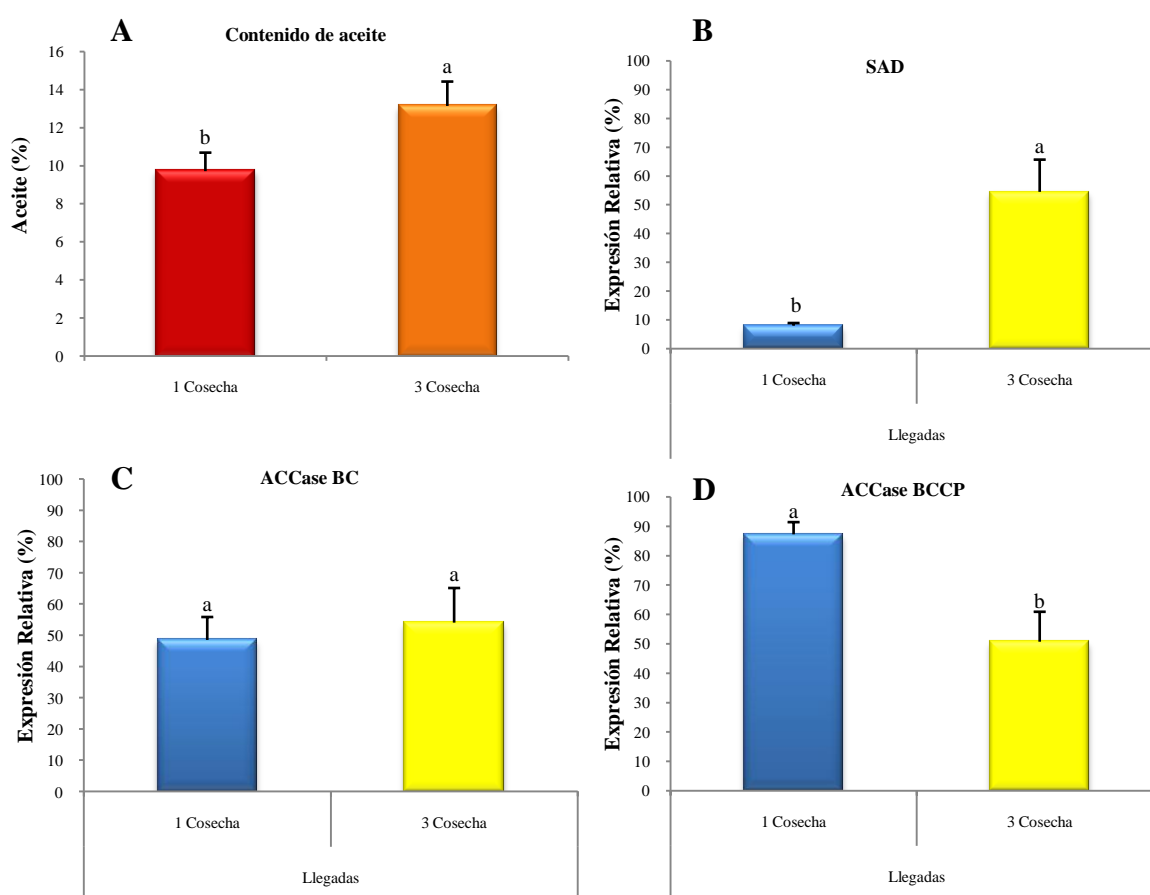


Figura 17. **Estudió de expresión mediante q-PCR en frutos de llegada correspondiente a la 1<sup>ra</sup> y 3<sup>ra</sup> cosecha.** Para la expresión relativa los genes fueron normalizados con el gen de mayor expresión. Panel A, Contenido de aceite en porcentaje. Panel B, Estudió de expresión de *PamSAD*. Panel C, Estudió de expresión de *PamACCase BC*. Panel D, Estudió de expresión de *PamACCase BCCP*. Letras diferentes en los gráficos representa diferencias significativas en las muestras mediante un análisis Anova con LSD,  $p < 0,05$ . Barras en los gráficos de expresión corresponden al error estándar (SE) de 6 muestras biológicas.

### 5.5. Análisis de expresión de *PamACCase BC*, *PamACCase BCCP* y *PamSAD* en frutos que presentaron pardeamiento interno

Se estudió la expresión de *PamSAD*, *PamACCase BC* y *PamACCase BCCP* (Figura 18) en aquellos frutos que presentaron gran incidencia de desórdenes interno tal como, pardeamiento de pulpa (Figura 18 A). Este desorden se observó en frutos que alcanzaron madurez de consumo después de estar almacenados 40 días a 0°C (Figura 18 A). Como análisis comparativo se seleccionó un grupo de frutos perteneciente a la misma cosecha los cuales fueron almacenados 40 días a 5°C en donde no se observaron daños internos (Figura 18 A). Por lo tanto, se observó que *PamSAD*, *PamACCase BC* y *PamACCase BCCP* tuvieron una disminución en su expresión en aquellos frutos con madurez de consumo después de estar almacenados 40 días a 0°C (Figura 18), cuando se compararon con aquellos frutos almacenados por el mismo período pero a 5°C.

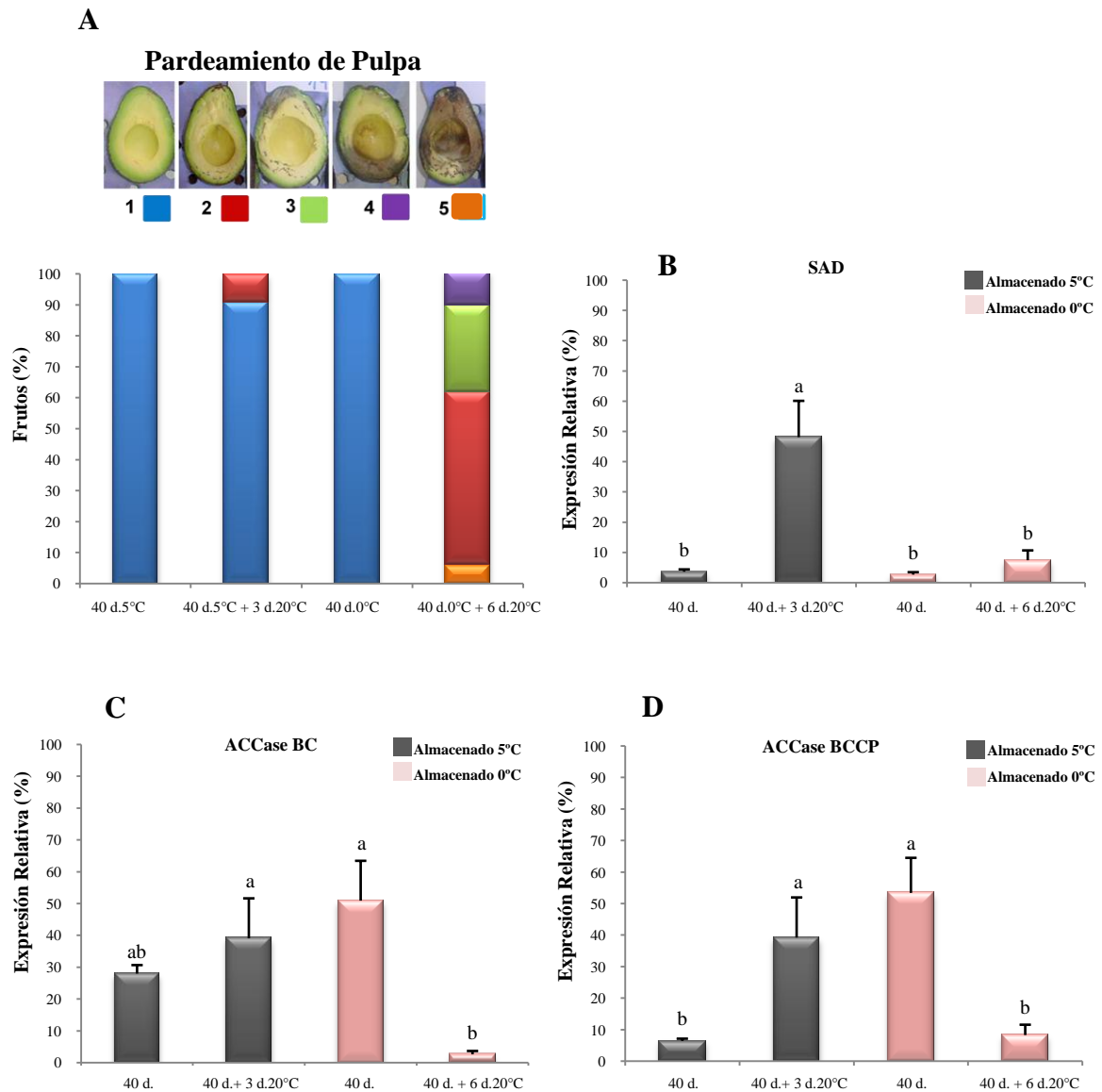


Figura 18. Estudio de expresión de *PamSAD*, *PamACCCase BC* y *PamACCCase BCCP* mediante q-PCR en frutos que presentan pardeamiento de pulpa. Para la expresión relativa los genes fueron normalizados con el gen de mayor expresión. A, Pardeamiento de pulpa (%) en frutos correspondientes a la 2<sup>da</sup> cosecha, los cuales fueron almacenados a 5°C y 0°C y analizados a los 40 días de almacenamiento en frío y cuando alcanzaron madurez de consumo, a su vez se observa la escala de pardeamiento de pulpa utilizada para ver la severidad de los daños. En los paneles B, C y D se grafican los niveles de expresión de los genes *estearoil acp* desaturasa (*PamSAD*), *acetil-Coa carboxilasa biotina carboxilasa* (*PamACCCase BC*), *acetil-Coa carboxilasa proteína transportadora de carboxil biotina* (*PamACCCase BCCP*), respectivamente en las mismas muestras descritas anteriormente. Letras diferentes en los gráficos representan diferencias significativas en las muestras mediante un análisis Anova con LSD,  $p < 0,05$ .

#### 5.6. Análisis de expresión de *PamACCcase BC*, *PamACCcase BCCP* y *PamSAD* en frutos sin desórdenes internos.

Para complementar el resultado de la figura 18 se estudió la expresión de *PamSAD*, *PamACCcase BC* y *PamACCcase BCCP* en frutos sin desórdenes interno al momento que alcanzaron madurez de consumo después de estar almacenados 40 días a 5 y 0°C, pero pertenecientes a la 1<sup>ra</sup> cosecha (Figura 19). La idea es ver si la época de cosecha tiene relación con la incidencia de desórdenes interno. Se observó que *PamSAD* tuvo una disminución en su expresión (Figura 19 B) en aquellos frutos que alcanzaron la madurez de consumo después de estar almacenados 40 días a 0°C cuando se comparo con aquellos frutos almacenados a 5°C, respecto a esto último, *PamACCcase BC* y *BCCP* no presentaron diferencias significativas en su expresión en los frutos con madurez de consumo almacenados bajo las mismas condiciones y tratamientos explicados anteriormente (Figura 19 C y D).

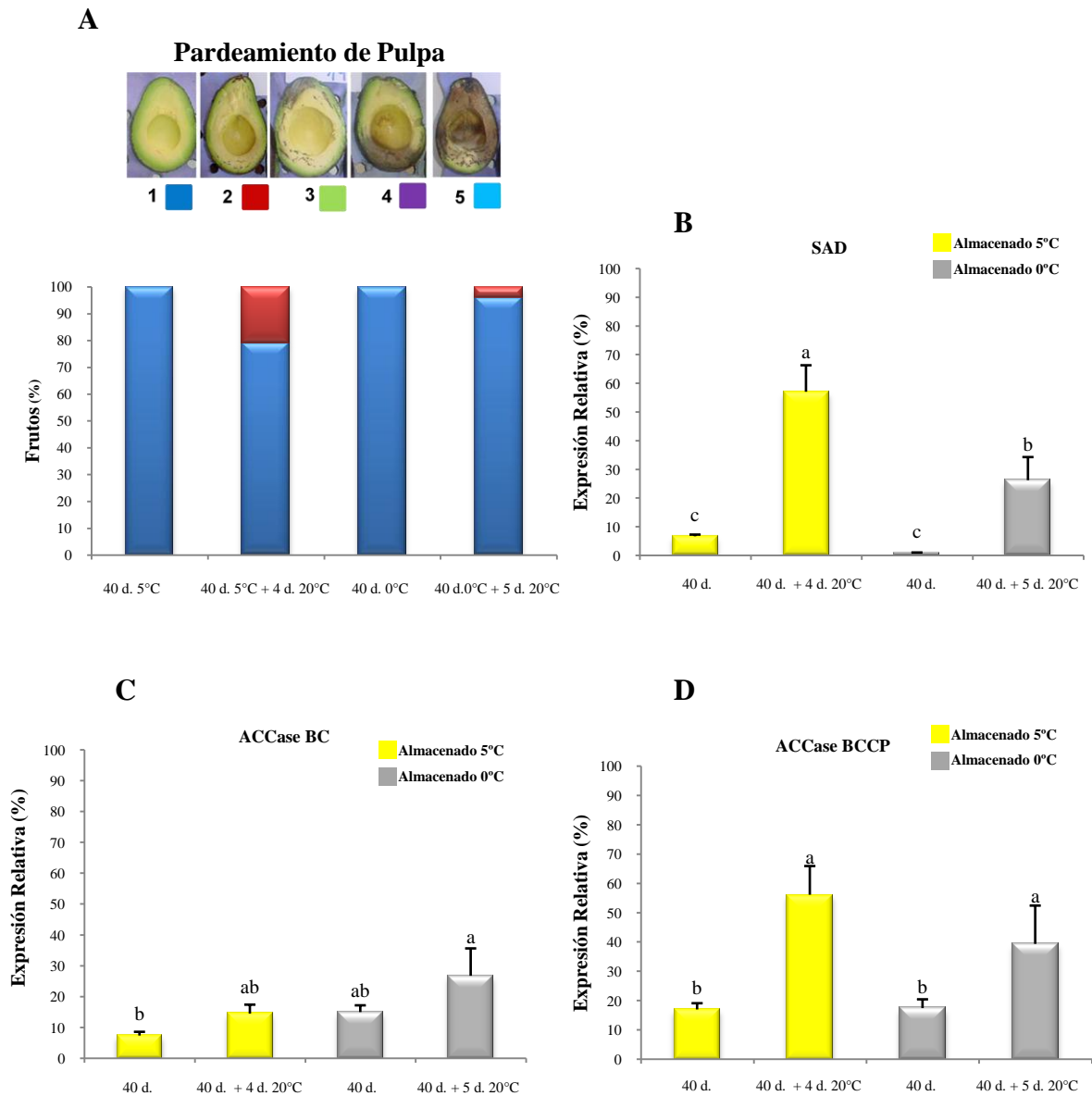


Figura 19. **Estudio de expresión mediante q-PCR en frutos que no presentan daño.** Para la expresión relativa los genes fueron normalizados con el gen de mayor expresión. Panel **A**, Pardeamiento de pulpa en frutos correspondientes a la 1<sup>ra</sup> cosecha, los cuales fueron almacenados a 5°C y 0°C y analizados a los 40 días (d) de almacenamiento en frío y cuando alcanzaron madurez de consumo, a su vez se observa la escala de pardeamiento de pulpa utilizada para la incidencia de daño. En los paneles **B**, **C** y **D** se grafican los niveles de expresión de los genes *Estearoil ACP desaturasa* (*PamSAD*), *Acetil-Coa carboxilasa biotina carboxilasa* (*PamACCase BC*) y *Acetil-Coa carboxilasa proteína transportadora de carboxil Biotina* (*PamACCase BCCP*), respectivamente en las mismas condiciones descritas anteriormente. Letras diferentes en los gráficos representan diferencias significativas en las muestras mediante un análisis Anova con LSD,  $p < 0,05$ . Barras en los gráficos corresponden al error estándar (SE) de 6 muestras biológicas.

5.7. Estudió de expresión de *Aminociclopropanocarboxilato oxidasa (PamACO)* en frutos tratados con el inhibidor de la percepción de etileno (1-MCP).

La enzima *PamACO* cataliza la oxidación de 1-aminoaciclopropano-1-carboxílico (*ACC*) a etileno, esta enzima presenta una expresión diferencial en la etapa de maduración de los frutos, por lo tanto se estudió el comportamiento de la enzima en la 1<sup>ra</sup> cosecha de palta cv. Hass en donde se observó un aumento en la expresión del transcrito a medida que aumentaba el período de almacenamiento refrigerado de los frutos apreciándose la máxima expresión al momento que alcanzaron la madurez de consumo después de 40 días de almacenamiento (Figura 20 A). Para ver el efecto de los frutos con el tratamiento de 1-MCP se estudio la expresión de *PamACO*, en donde se observó una disminución en su expresión en los frutos con dicho tratamiento (Figura 20 B).

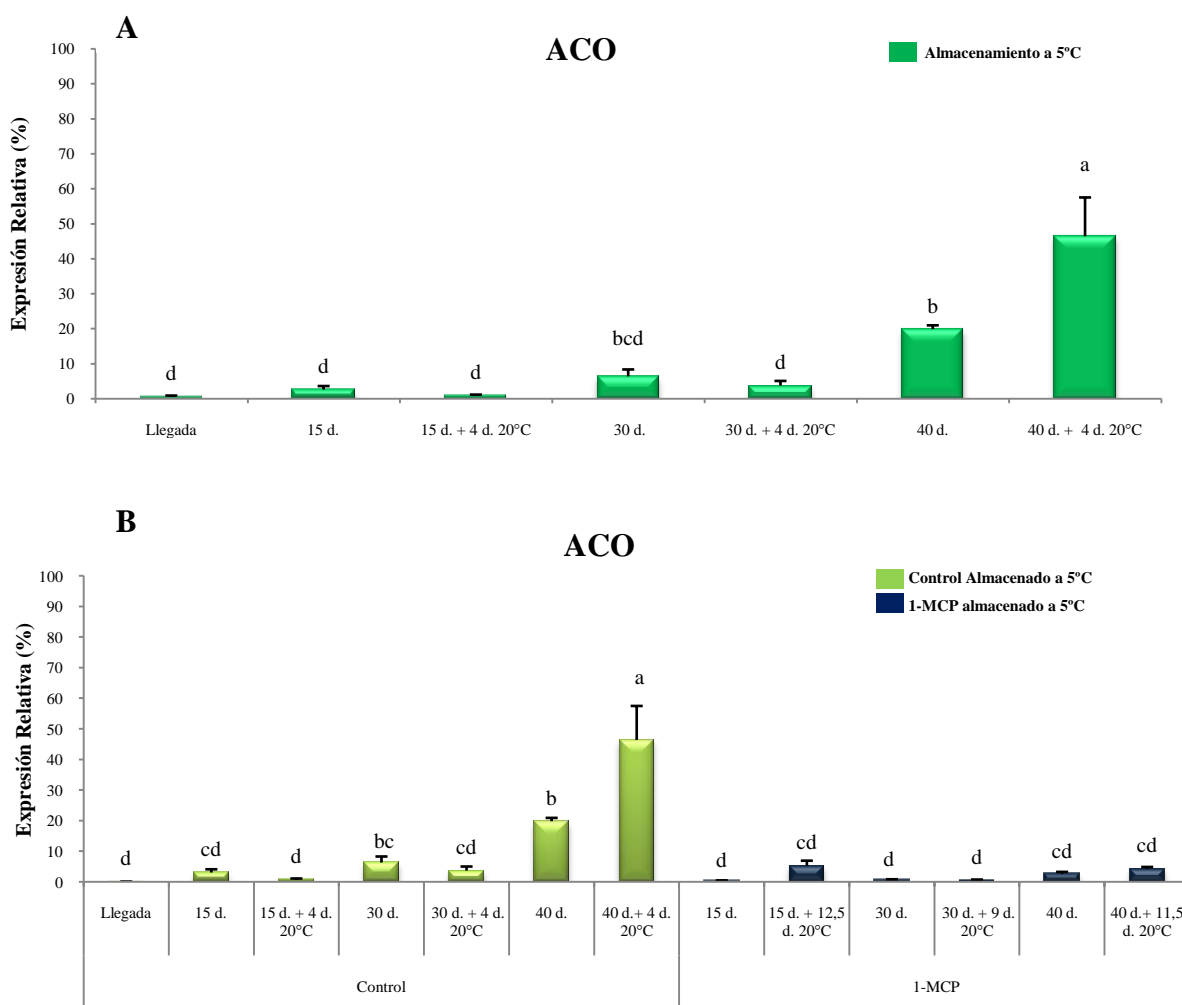


Figura 20. **Estudió de expresión mediante q-PCR en frutos almacenados por 15, 30 y 40 días en frío y cuando alcanzan madurez de consumo (SL) de frutos control y tratados con 1-MCP.** Para la expresión relativa los genes fueron normalizados con el gen de mayor expresión. **A**, Expresión de *PamaACO* en frutos correspondiente a la 1<sup>ra</sup> cosecha. **B**, Expresión de *PamACO* en la 1<sup>ra</sup> cosecha en frutos control y tratados con 1-MCP. Letras diferentes en los gráficos representan diferencias significativas en las muestras mediante un análisis Anova con LSD,  $p < 0,05$ . Barras en los gráficos corresponden al error estándar (SE) de 6 muestras biológicas.

### 5.8. Estudio de expresión de *PamSAD*, *PamACCcase BC* y *PamACCcase BCCP* en frutos tratados con el inhibidor de la percepción de etileno (1-MCP).

Como el etileno es una de las principales hormonas que afecta el proceso de crecimiento y desarrollo, incluyendo la maduración y senescencia de los frutos, se quiso estudiar el efecto de esta hormona sobre los genes *PamSAD*, *PamACCcase BC* y *PamACCcase BCCP*. Por lo tanto, se estudió la expresión de ellos en muestras correspondientes a la 1<sup>ra</sup> cosecha tratadas con 1-MCP, en donde *PamSAD* y *PamACCcase BCCP* tuvieron una disminución en su expresión cuando se compararon frutos (control y 1-MCP) con madurez de consumo después de 40 días almacenados a 5°C (Figura 21 A y C), en cambio, *PamACCcase BC* no presentó diferencias significativas en su expresión cuando se compararon frutos con y sin aplicación de 1-MCP (Figura 21 B).

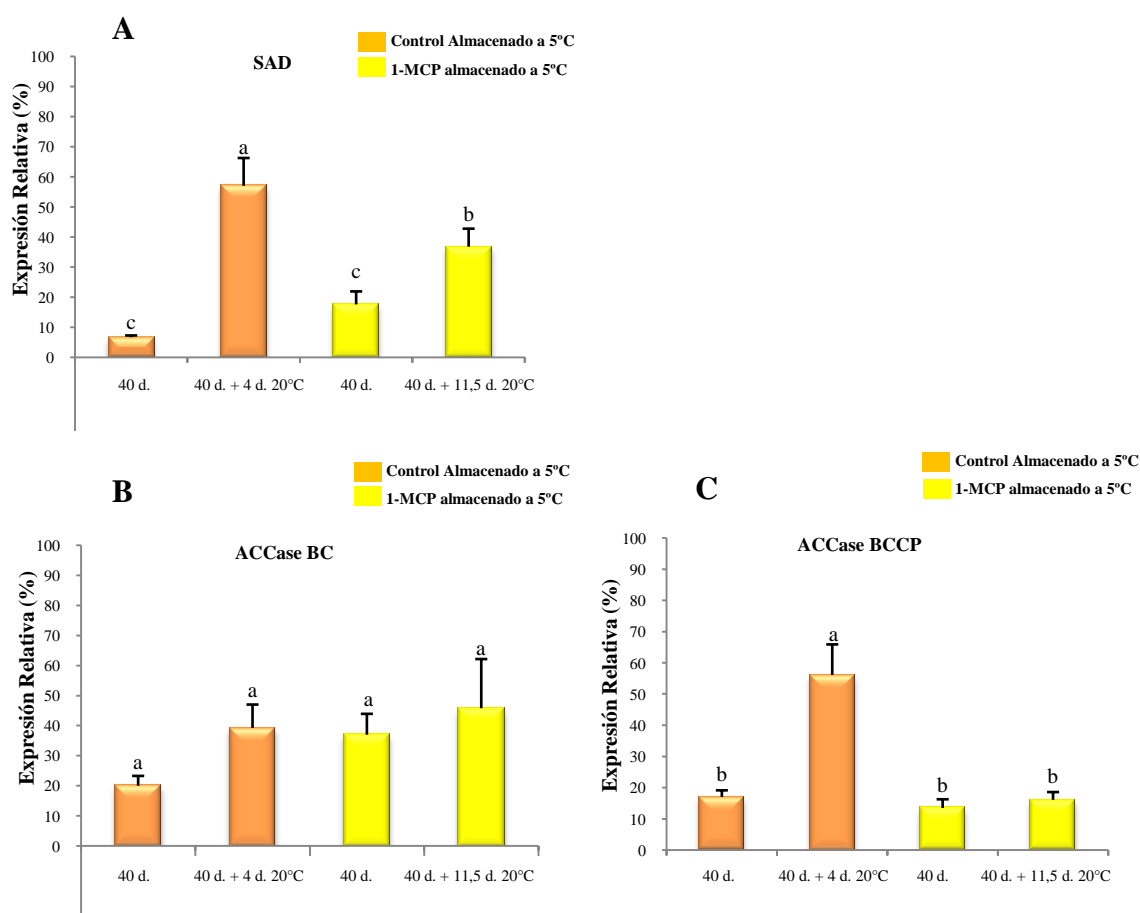


Figura 21. Análisis de expresión de los genes en estudio en frutos tratados con 1-MCP y almacenados por 40 días en frío y cuando alcanzan madurez de consumo. Para la expresión relativa los genes fueron normalizados con el gen de mayor expresión. Se utilizó frutos almacenados por 40 días (d) a 5°C y cuando alcanzaron madurez de consumo (SL) correspondientes a la 1<sup>ra</sup> cosecha. Panel A, expresión de *PamSAD* en frutos control y tratados con 1-MCP. Panel B, expresión de *PamACCcase BC* en frutos control y tratados con 1-MCP. Panel C, Expresión de *ACCcase BCCP* en frutos control y tratados con 1-MCP. Letras diferentes en los gráficos representan diferencias significativas en las muestras mediante un análisis Anova con LSD,  $p < 0,05$ . Barras en los gráficos corresponden al error estándar (SE) de 6 muestras biológicas.



## Discusión

### 1. Caracterización del estado de madurez.

#### *Firmeza.*

La firmeza de los frutos a la llegada de cada una de las 3 cosechas presentaron diferencias significativas en sus promedios, la cual se puede observar en la tabla 3, en donde los valores se encontraban en un rango de 31 a 26 kgf. Esto último nos estaría indicando que los frutos cosechados tardíamente se encontrarían en un estado de madurez más avanzado que los de cosecha temprana, lo cual se puede observar por la disminución en el ablandamiento de aquellos frutos cosechados tardíamente. Al evaluar la fruta luego 30 y 40 días almacenados a 0°C y 5°C con 1-MCP se observó que aquellos frutos fueron más firmes y presentaban diferencias significativas comparada con el control almacenado a 5°C (Tabla 4,5 y 6); por lo tanto, nos indicaría que frutos tratados con 1-MCP mantiene y prolonga la firmeza de los frutos después de la cosecha. Resultados similares fueron observados por Woolf *et al* (2004), en frutos de paltas tratados con 1-MCP. A su vez, los frutos después del período de almacenamiento refrigerado (5°C y 0°C) alcanzaron la madurez de consumo en el rango de 2 a 5 días, mucho menor cuando fueron comparada con los frutos tratados con 1-MCP, los cuales alcanzaron la madurez de consumo en el rango de 4 a 12 días (Tablas 4,5 y 6). Por lo tanto, se corrobora lo que dice Pesis *et al* (2002), que 1-MCP produce un retraso en la madurez de paltas cv. Hass independiente del período de cosecha.

#### *Color.*

Respecto al color externo de los frutos, estos tuvieron un comportamiento normal en el proceso de maduración, observándose frutos de color verde a la salida del almacenamiento en frío y coloreado (todos los frutos tenían aproximadamente 90% de coloración negra) en el momento que alcanzaron la madurez de consumo (Tablas 7, 8 y 9), este comportamiento se observó en todos los frutos de los diferentes tratamientos y fue similar a lo descrito por Woolf *et al* (2004).

#### *Contenido de aceite.*

Los frutos fueron cosechados en tres estados de madurez dependiendo de la época de colecta de la fruta: 1<sup>ra</sup> cosecha, la cual tenía un porcentaje de aceite de 9,7 %; 2<sup>da</sup> cosecha con un 12,3 % de aceite y 3<sup>ra</sup> cosecha con 13,1 % de aceite (Tabla 10). Se observaron diferencias

significativas comparando frutos cosechados tempranamente y tardíamente (Tabla 10), lo cual nos indicaría que a medida que el fruto se desarrolla en el árbol existe un incremento en el contenido de aceite, lo cual es también descrito por Ozdemir y Topuz (2003), Requejo-Tapia *et al.* (1999). La importancia de la medición del porcentaje de aceite es debido a que es el mejor indicador del estado de madurez de la palta.

#### *Desórdenes fisiológicos.*

Para el análisis de la aparición y desarrollo de desórdenes fisiológicos se consideró como frutos con daño, a aquellos que presentaban valores iguales o superiores a 3 utilizando la escala no paramétrica de daño según las figuras 6A y 7A. Los desórdenes fisiológicos estudiados en esta tesis corresponden al pardeamiento de pulpa y pardeamiento vascular, ambos se manifestaron en el momento en que los frutos alcanzaron la madurez de consumo después del período de almacenamiento refrigerado. Respecto al pardeamiento de pulpa, se observó una mayor incidencia de este desorden en frutos que fueron cosechados tardíamente y principalmente en aquellos que fueron almacenados por 40 días 0°C, lo cual se puede observar en la figura 6; resultados similares fueron observados por Dixon 2003. En los frutos tratados con 1-MCP se observó una leve disminución en la incidencia de pardeamiento de pulpa comparado con su control. Respecto a esto último, Woolf *et al.* (2004) reportó un resultado similar, en donde se observó una disminución en este desorden en frutos almacenados por 7 semanas a 5,5°C tratados con 1-MCP, la disminución de este desorden también fue observado por Pesis *et al.* (2002).

Otro desorden estudiado es el pardeamiento vascular, en donde no se observó mayor incidencia de este daño en los frutos, independiente de la temperatura y período de almacenamiento o tratamiento aplicado (1-MCP) (Figura 7). Respecto a los frutos tratados con 1-MCP Woolf *et al.* (2004) obtuvo un resultado similar, en donde frutos almacenados por 4 y 7 semanas a 5,5 °C no presentaban una gran incidencia de pardeamiento vascular comparado con el control. Por lo tanto, podemos decir para ambos pardeamientos, que la incidencia y severidad de los daños depende de la temperatura de almacenamiento, período de almacenamiento y estado de madurez de los frutos (Lizana *et al.*, 1992). Según describe Undurraga *et al.* (2003) uno de los problemas que presentan los frutos cosechados tardíamente es una disminución en la concentración de calcio en los tejidos, lo cual afecta la estabilidad de las membranas de las células haciendo que estas sean más sensibles a las bajas temperatura y como consecuencia produce un aumento en la incidencia de desórdenes fisiológicos. Lo

anterior sumado a lo que describe Will *et al.* (1981), la manifestación de los desórdenes fisiológicos puede generarse en respuesta a un ambiente adverso, como es la temperatura o a la deficiencias nutricionales durante el crecimiento y desarrollo del fruto. Por lo tanto, para complementar los resultados de esta tesis se recomendaría la medición de calcio en frutos de cosechas tardías, para observar si este elemento tiene incidencia en la aparición de los desórdenes fisiológicos.

### 1.1. Caracterización molecular de *PamACCase BC* y *PamACCase BCCP*

En plantas la biosíntesis de ácidos grasos ocurre en el cloroplasto, en donde la enzima heteromérica Acetil CoA Carboxilasa (ACCCase) es la encargada de producir el primer sustrato de la vía, el malonil CoA. La carboxilación de acetil-CoA para formar malonil-CoA ocurre en 2 pasos: A) la carboxilación dependiente de ATP del grupo prostético biotina la cual está unida a la enzima y B) la transferencia del grupo carboxil que esta unidad a biotina a acetil-CoA para formar malonil-CoA. Esta enzima está compuesta por 4 subunidades: BC, BCCP,  $\alpha$ -CT y  $\beta$ -CT (Sasaki y Nagano, 2004). Como resultado de esta tesis se identificó y se obtuvo los transcritos de largo completo de las subunidades biotina carboxilasa (BC) (Figura 8) y proteína transportadora de carboxil biotina (BCCP) (Figura 10) de la enzima Acetil CoA carboxilasa correspondiente a *Persea americana*. Respecto a las otras dos subunidades,  $\alpha$ -CT y  $\beta$ -CT, las cuales fueron analizadas de la misma forma que BC y BCCP, no fueron identificadas en palta, al menos en los tejidos estudiados en esta tesis (datos no mostrados).

Las secuencias tanto nucleotídica y aminoacídica de *PamACCCase BC* y *PamACCCase BCCP* tuvieron un alto porcentaje de identidad con las secuencias ortólogas de otras especies de vegetales. Específicamente la estructura primaria de ambas proteínas fueron altamente conservadas entre todas las especies, especialmente los dominios funcionales identificados y analizados. Mediante la comparación de la secuencia *ACCCase BC* de *Arabidopsis thaliana* (AAC09008) caracterizada por Sun *et al.* (1997) con nuestra *ACCCase BC* de *P. americana*, se logró identificar 4 subdominios los cuales son altamente conservados entre las enzimas con posible función de biotina carboxilasa, estos corresponden a: i) sitio de unión de ATP, el cual es común en muchas enzimas dependiente de ATP envueltas en la síntesis de macromoléculas, ii) el sitio de biotina carboxilacion el cual estaría probablemente relacionado en la síntesis del producto carboxi-biotina; y los dominios iii) BC-1; iv) BC-2 los cuales no se tiene claro las funciones bioquímica (Figura 9). A su vez *PamACCCase BC* se expresa en diferentes tejidos de *P. americana* tales como; hoja, botón, flor, fruto inmaduro y fruto

maduro (Figura 12). Resultados similares respecto a los dominios estructurales fueron obtenidos por Meng-Jun *et al.* (2010), en donde se aisló y caracterizó la enzima heteromérica Acetil – CoA carboxilasa de maní (*Arachis hypogaea*), además esta fue expresada en raíces, hojas, flores, botones y semillas, lo cual nos indicaría que *ACCcase* no es específica de algún tejido celular independiente de la especie que se estudia, pero su expresión puede variar dependiendo del estado de desarrollo que se encuentre el fruto o vegetal.

Respecto a *PamACCcase BCCP*, en la figura 11 se puede observar la conservación del extremo C-terminal a través del alineamiento múltiple, en el se puede apreciar el motivo biotilación el cual posee un residuo de lisina que posiblemente sería el aminoácido en el cual se une el cofactor biotina. Este motivo también fue identificado por Choi *et al.* 1995, el cual clonó y caracterizó la subunidad que posee el motivo biotina de la enzima *Acetil - CoA carboxilasa* cloroplastica de *Arabidopsis thaliana* y por Reverdatto *et al.*, (1999), el cual caracterizó la enzima heteromérica *Acetil – CoA carboxilasa* de *Glycine max.* *PamACCcase BCCP* no se expresó en todos los tejidos analizados (Figura 12), contrario a lo visto por Meng-Jun *et al.* (2010) en maní, en donde *ACCcase BCCP* se expresó en todos los tejidos que ellos estudiaron. Esto nos podría indicar que *ACCcase BCCP* de palta podría tener diferentes regulaciones dependiendo del tejido. El análisis filogenético de *PamACCcase BC* demostró que a pesar de tener un porcentaje de identidad alto entre las secuencias ortólogas la cercanía que existe entre ellas es bajo (Figura 9 II), resultados similares fueron observados en *PamACCcase BCCP* (Figura 11 II) pero con la diferencia que esta fue menos divergente con la secuencia de tomate. La divergencia que puede existir entre los genes podría deberse a que el programa utiliza la secuencia completa para la creación del árbol filogenético y no únicamente los dominios conservados.

Para identificar la posible localización subcelular de *PamACCcase BC* y *PamACCcase BCCP* se utilizó el Software TargetP el cual predijo un péptido de tránsito al cloroplasto, donde los primeros 43 y 60 aminoácidos de las proteínas *PamACCcase BC* y *PamACCcase BCCP* son ricos en serina, treonina, arginina y aminoácidos hidrofóbicos (alanina y valina), los cuales son característicos de un péptido de tránsito hacia el cloroplasto (Shorrosh *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 1995), ya que estudios realizados por Kenneth *et al.* (1989) demostró la conservación de ciertos residuos aminoacídicos los cuales fueron nombrados anteriormente, en una gran variedad de genes con señal de tránsito hacia el cloroplasto.

Se realizó el análisis de las secuencias UTR mediante el servidor UTRdb (Grillo *et al.*, 2009) con el propósito de encontrar posibles motivos de regulación para los genes

*PamACCase BC* y *PamACCase BCCP*. Respecto a esto último, no se encontraron patrones o motivos que puedan interactuar con proteínas específicas que se unen a RNA, las cuales pueden controlar la traducción, degradación y localización, a su vez se pueden encontrar codones de inicio, codones de término y señales de poliadenilación (Mignone *et al.*, 2002). La posible explicación que llevó a no encontrar ningún motivo de regulación es que para ambas secuencias la metodología utilizada no fue la más correcta o el programa utilizado no fue capaz de identificar motivos debido a que esta especie vegetal aún no ha sido secuenciada y/o por otra parte, que no se tenían los UTR completos; respecto a *PamACCase BC* faltaban parte de los 5' y 3' UTR (Figura 5), en cambio para *PamACCase BCCP* faltaba parte del 5'UTR (Figura 7). Sun *et al.* 1997, identificó en el 5' UTR de *ACCCase BC* de *Arabidopsis thaliana* codones de termino en los 3 marco de lectura y en el 3'UTR una señal de poliadenilación putativa, ATAATTT. Shorosh *et al.* 1995, identificó en la región 3'UTR de *ACCCase BCCP* de *Arabidopsis thaliana* 2 señales de poliadenilación putativas, ATATAA y TTAAAT.

#### 1.2. Análisis de expresión mediante q-PCR en frutos con desórdenes fisiológicos.

Los resultados de expresión mediante PCR en tiempo real fueron normalizados utilizando como gen de expresión constitutiva *Rubisco* (Genbank: AY337727). Éste fue identificado como tal para palta, pues no presentó diferencias significativas en las muestras con diferentes tratamientos o condiciones de almacenamiento (Figura 16).

*PamACCase BCCP* y *PamSAD* presentaron diferencias significativas en frutos de llegada (a cosecha) cosechados temprana (1<sup>ra</sup> cosecha) y tardíamente (3<sup>ra</sup> cosecha) (Figura 17). El aumento de expresión de *PamSAD* (Figura 17 B) se puede relacionar probablemente con un aumento en la actividad de la enzima en frutos de cosechas tardía y con el aumento en el porcentaje de aceite (Figura 17 A), debido a que los frutos en el árbol siguen su proceso de maduración, lo cual produce un aumento en el tamaño y contenido de aceite en frutos cosechados tardíamente. Esto último podría significar un aumento en la expresión y actividad de enzimas relacionadas con la biosíntesis de lípidos. Como no se analizó la cantidad de ácidos grasos de los frutos, principalmente ácido oleico, el cual es sintetizado por la enzima *SAD*, no nos permite hacer una relación directa con el aumento de su expresión; sin embargo, Ozdemir y Topuz., (2004), ha descrito que en frutos de palta cv. Hass cosechados tardíamente se observa un aumento en el contenido de ácidos grasos, específicamente, ácido oleico, observándose el mismo efecto en el cv. Fuerte, lo cual podría relacionarse con lo

observado por nosotros. Por lo tanto, para complementar los resultados de expresión de *PamSAD* se debería medir la cantidad de ácidos grasos en los frutos y poder ver si su comportamiento es similar a lo visto en su perfil de expresión.

Respecto a *PamACCcase BCCP*, este presentó una disminución en su expresión en frutos de cosechas tardías (Figura 17 D) lo cual nos podría indicar que esta subunidad es regulada dependiendo del estado de desarrollo del fruto ya que, Ke *et al.*, (2000) observó un aumento en la expresión de *ACCcase BCCP* en etapas tempranas del desarrollo de semillas de *Arabidopsis thaliana* y posteriormente una disminución en etapas tardía. *PamACCcase BC* no presentó diferencia en su expresión en frutos de cosechas temprana y tardía (Figura 17 C), lo cual nos dice que las diferentes subunidades que conforman a *PamACCcase* pueden tener diferentes regulaciones transcripcionales (Sasaki y Nagano, 2004).

El almacenamiento refrigerado de frutas y vegetales permite la preservación de sus cualidades después de la cosecha, porque las bajas temperaturas disminuyen la velocidad del metabolismo celular y atrasa la senescencia y maduración de los frutos (MaGlasson *et al.*, 1979). Sin embargo, ciertos frutos tropicales y subtropicales les afectan este tipo de almacenamiento, el cual causa la aparición de desórdenes fisiológicos cuales afectan negativamente la calidad de ellos. Por lo tanto, para poder ver si el daño por frío es el causante de la aparición de desórdenes internos en paltas cv. Hass provenientes de cosechas tardías, se almacenaron frutos por 40 días a 0°C, en donde se observó una gran incidencia de pardeamiento interno después del período de almacenamiento refrigerado (Figura 18 A). Respecto a esto último, se estudió la expresión de los genes *PamACCcase BC*, *PamACCcase BCCP* y *PamSAD* en aquellos frutos que presentaron gran incidencia de daño, principalmente pardeamiento de pulpa, en donde se observó que *PamSAD* no presentó variación en su expresión cuando se comparó frutos con daño y sin daño (Figura 18 B y 19 B), pero si presentó diferencias significativas cuando alcanzaron la madurez de consumo después del almacenamiento refrigerado (0°C y 5°C), independiente de la época de cosecha. Por lo tanto, estos resultados nos dice que *PamSAD* no tendría relación con la incidencia de desórdenes interno, pero su expresión si estaría siendo afectada por el almacenamiento a bajas temperaturas (Figura 18 y 19). Distinto es el caso de *PamACCcase BC* y *PamACCcase BCCP* que si mostraron una disminución en su expresión en aquellos frutos cosechados tardíamente (2<sup>da</sup> cosecha) que presentaron gran incidencia de pardeamiento interno (Figura 18 C y 18 D); expresión que no se ve modificada cuando se estudian estos dos genes en frutos cosechados tempranamente (1<sup>ra</sup> cosecha) y que no presentan daño al momento de madurar, independiente

de la temperatura de almacenamiento (Figura 19 C y 19 D). Por lo tanto, podemos decir que *PamACCcase BC* y *PamACCcase BCCP* podrían estar relacionados con la incidencia de desórdenes internos, tal como pardeamiento de pulpa. Lo anterior podría estar relacionado con que la sensibilidad de los frutos a bajas temperaturas puede ser dependiente del estado de desarrollo del fruto o esta misma condición de almacenamiento produce cambios en la composición de los lípidos (Marangoni *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2005). Por lo tanto, estos cambios pueden inducir la expresión y/o actividad de una gran variedad de enzimas relacionadas con la biosíntesis de lípidos.

### 1.3. Efecto de etileno en la expresión de los genes *PamACCcase BC*, *PamACCcase BCCP* y *PamSAD*.

El incremento en la producción de etileno esta dado por el estado de desarrollo del fruto, como la maduración, el cual va acompañado con un incremento en los transcritos y actividad de las enzimas *1-aminoaciclopropano-1-carboxílico sintasa* y *PamACO* (Mathooko *et al.*, 2010). Respecto a esto última, se observó una baja expresión de *PamACO* a cosecha, la cual incrementa en correlación con el aumento del estado de madurez de los frutos (Figura 20 A), observándose al cuarto día en que los frutos alcanzaron la madurez de consumo después de 40 días almacenados a 5°C la máxima expresión, la cual probablemente coincidiría con el peak de etileno. Resultados similares fueron obtenidos por Owino *et al.*, 2002 en frutos de paltas. Como se ha descrito anteriormente, el etileno es uno de varios reguladores de crecimiento de las plantas, que afecta los procesos de desarrollo incluyendo la maduración y senescencia (Abeles *et al.*, 1992), por lo tanto, la utilización de 1-MCP el cual inhibe la acción de etileno, se ha descrito que atrasa el tiempo de alza climática de éste (Feng *et al.*, 2000) lo cual se puede observar en la figura 20 B en donde los frutos tratados con 1-MCP no se observó dicho evento cuando se comparó con su control, por lo tanto se confirma lo descrito por una gran cantidad de autores (Feng *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2002; Hershkovitz *et al.*, 2005) en la disminución en la tasa de producción de etileno lo cual produce un retardo en la maduración en una gran cantidad de frutos.

Con el propósito de estudiar si el etileno tiene alguna regulación sobre los genes en estudio: *PamACCcase BC*, *PamACCcase BCCP* y *PamSAD*; se estudió la expresión de ellos en frutos tratados con 1-MCP, en donde se observa en la figura 18 B que el gen *PamACCcase BC* no presentó diferencias significativas en su expresión cuando se comparó con su control (sin aplicación de 1-MCP). Respecto a la figura 21 A y C, se puede observar que *PamSAD* y

*PamACCase BCCP* presentaron diferencias significativas en los frutos tratados con 1-MCP. Los resultados observados en la figura 21 nos indicarían que probablemente *PamACCase BC* no tiene elementos reguladores que responden a etileno, caso contrario con *PamACCase BCCP* y *PamSAD*, los cuales presentaron una disminución en su expresión en frutos tratados con 1-MCP. Para poder comprobar si los genes en estudio poseen elementos reguladores que responden a etileno, se debería estudiar las secuencias promotoras fusionadas a algún gen reportero y poder ver si este último es expresado en presencia de etileno.

La importancia de saber si los genes en estudio son regulados por etileno, es debido a que el desarrollo de los síntomas de daño por frío ocurre cuando los frutos son transferidos a la cámara de maduración, después del almacenamiento refrigerado y esto se correlaciona con un incremento en la producción de etileno (Baladrán-quintana *et al.*, 2003), el cual puede ser debido a i) una simple respuesta al almacenamiento refrigerado o ii) el etileno puede inducir daño por frío en especies sensibles a las bajas temperaturas.



## Conclusión

Las subunidades *BC* y *BCCP* perteneciente a la enzima heteromérica *ACCase* de *Persea americana* mostraron una alta conservación en sus dominios funcionales comparadas con otras *ACCase* de diferentes especies, las cuales fueron analizadas desde el punto de vista molecular y bioquímico, por lo tanto, se puede concluir que los genes identificados en esta tesis probablemente correspondería a las subunidades *BC* y *BCCP* de *ACCase*.

Un fruto cosechado tardíamente es más susceptible al pardeamiento interno, como el pardeamiento de pulpa, cuando es almacenado a 0°C (condición de *Chilling Injury*) en donde se observó una gran incidencia de daño y una disminución en la expresión de *PamACCase BC* y *PamACCase BCCP* cuando los frutos alcanzaron la madures de consumo después de 40 días almacenados. Por lo tanto, nuestros resultados nos podrían sugerir que estos genes estarían relacionados con los desórdenes fisiológicos estudiados, específicamente pardeamiento de pulpa. *PamSAD* no presentó cambio en su perfil de expresión en frutos con pardeamiento interno por lo que probablemente no estaría relacionado con este tipo de desorden fisiológico pero si se observo una disminución en su expresión en frutos tratados con 1-MCP lo cual probablemente nos indicaría que *PamSAD* y *PamACCase BCCP* el cual también presento una disminución en su expresión en frutos tratados con 1-MCP, podrían tener secuencias reguladoras que responden a etileno. La identificación de nuevos genes relacionados con la incidencia de pardeamiento interno en palta, específicamente *PamACCase BCCP* cual fue expresado principalmente en frutos maduros (en donde ocurren los daños), es una característica importante ya que puede ser utilizado como posible marcador de daño.

Como proyecciones de esta tesis, están el ver si el almacenamiento refrigerado a 0°C tiene alguna incidencia en la biosíntesis de etileno, lo cual podría aumentar la aparición de desórdenes fisiológico en los frutos, y a su vez, observar si esta alteración tiene algún efecto en la expresión de los genes identificados en esta tesis. Por lo tanto, para complementar lo descrito anteriormente se realizaría los análisis correspondientes para la validación de *PamACCase BCCP* como posible marcador de daño. Por otro lado, estudiar los perfiles de ácidos grasos bajo diferentes tratamientos y condiciones de almacenamiento y poder relacionarlos con la incidencia de desórdenes fisiológicos y a su vez estudiar las secuencias promotoras de *PamSAD* y *PamACCase BCCP* para ver si tienen elementos reguladores que responden a etileno, ya que esta hormona estaría posiblemente relacionada con la incidencia de desórdenes fisiológicos

## Bibliografía

**Abeles, F.B.; Morgan, P.W. and Salveit, M.** (1992). Ethylene in plant biology. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, New York, EEUU. 414 p.

**Adkins, M.F., Hofman, P.J., Stubbings, B.A., Macnish, A.J.** (2004). Manipulating avocado ripening with 1-methylcyclopropene (EthylBlock®). *Postharv. Biol. Technol.* 35: 31–40.

**Aguirre, M.** (1994). Efectos del anhídrido carbónico y atmósfera controlada en la calidad de postcosecha de frutos de *Persea americana* Mill. cv. Fuerte. Trabajo de tesis de Magister en Ciencias Agropecuarias, mención Producción Frutícola. Santiago, Chile, Universidad Católica de Chile, Facultad de Ciencia Agrarias y Forestales. 103 p.

**Aguirre, M; Lizana, I y Berger, H.** (1995). Desórdenes fisiológicos en paltas. In: IV Simposio Internacional de Manejo, Calidad y Fisiología de postcosecha de Frutos. Facultad de Agronomía, Universidad de Chile. Publicaciones Misceláneas Agrícolas N° 42. pp 77-83.

**Artes, F., y Artes-Hernandez, F.** (2003). Daños por frío en la postrecolección de frutas y hortalizas. *Avances en Ciencias y Técnicas del frío-1*, ed. UPCT y SECYTEF, pp. 299-310.

**Autio, WR., y Bramlage, WJ.** (1986). Chilling sensitivity of tomato fruit in relation to ripening and senescence. *J Amer Soc Hort Sci.* 111: 201-204.

**Badea, C., Basu, K.S.** (2009). The effect of low temperature on metabolism of membrane lipids in plant and associated gene expression. *plant om jour.* 2: 78-84.

**Balandrán-Quintana, RR., Mendoza-Wilson, AM., Gardea-Béjar, AA., Vargas-Arispuro, I., y Martínez-Tellez, MA.** (2003). Irreversibility of chilling injury in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.) could be a programmed event long before the visible symptoms are evident. *Biochem Biophys Res Comm.* 307: 553-557.

**Barrientos, V. del C.** (1993). Efecto de distintas concentraciones de gases (CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>) en la conservación de palta cv. Fuerte. Tesis Ing. Agr., Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 74 p

**Bean, R.C.** (1958). Changes in sugar during growth and storage of avocado. *California Avocado Society Yearbook.* pp. 42-90.

- Berger, H; Auda, C. y González, E.** (1982). Almacenamiento de paltas (*Persea americana* Mill.) cv. Fuerte y Hass en atmósfera controlada, modificada y refrigeración común. *Simiente* 52:5560.
- Biale, J. and Young, R.** (1971). The avocado pear. In: Malino, A. ed. *The biochemistry of fruits and their producís.* London, Academic Press, pp.1-63.
- Boller T., Hernel R.C., Kende H.** (1979). Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta* 145: 293–303
- Blankenship, S.M., Dole, J.M.** (2003). 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharv. Biol. Technol.* 28: 1–25.
- Calabrese,F.** (1992). *El aguacate.* Madrid, Mundi-Prensa. 249 p.
- Carrillo, C.H.** (1991). Almacenaje de frutos de palto (*Persea americana* Mill.) cv. Fuerte en atmósfera controlada. Tesis Ing. Agr., Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 84 p.
- Cutting, J.G.M., Wolstenholme, B.N. and Hardy, J.** (1992). Increasing relative maturity alters the base mineral composition and phenolic concentration of avocado fruit. *J.Hort. Sci.* 67(6): 761-768.
- Chaplin, G.R., Wills, R.B.H., Graham, D.** (1983). Induction of chilling injury in stored avocados with exogenous ethylene. *HortScience.* 18: 952–953.
- Choi, J.K., Yu, F., Wurtele, E.S., and Nikolau, B.J.** (1995). Molecular Cloning and Characterization of the cDNA Coding for the Biotin-Containing Subunit of the Chloroplastic Acetyl-Coenzyme A Carboxylase. *Plant Physiol.* 109: 619-625.
- Demirkol A, Pekmezci M.** (1999). Researches on fruit growing and development course as well as determining harvest maturity of “Hass” and “Fuerte” avocado cultivars grown under Antalya conditions. Turkey III.National Horticulture Congress, Ankara. pp 590-594
- De Palma M, Grillo S, Massarelli I, Costa A, Balogh G, Vigh L, Leone A.** (2008). Regulation of desaturase gene expression, changes in membrane lipid composition and freezing tolerance in potato plants. *Molecular Breeding* 21: 15-26

- Dixon, J.** (2003). New Zealand Avocado Fruit Assessment Manual. Version 3.0, August 2003. New Zealand Avocado Industry Council Ltd., Tauranga, New Zealand.
- Dopico, B., Lowe, A.L., Wilson, I.D., Merodio, C., Grierson, D.** (1993). Cloning and characterization of avocado fruit mRNAs and their expression during ripening and low-temperature storage. *Plant Mol Biol.* 21: 437-449.
- Dornbos D.L., Mullen R.E., Hammond E.G.** (1989) Phospholipids of environmentally stressed soybean seeds. *J Am Oil Chem Soc.* 66: 1371-1373
- Eaks, I.L.** 1976. Ripening, chilling injury and respiratory responses of "Hass" and "Fuerte" avocado fruits at 20°C following chilling. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 10:538-540.
- Ebel J, Hahlbrock K.** (1977). Enzymes of flavone and flavonol-glycoside biosynthesis: coordinated and selective induction in cell-suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Eur J Biochem.* 75: 201–209
- Esteban, P.C.** (1993). Estimación del contenido de aceite a través de la humedad y su relación con la palatabilidad en frutos de paltos de las variedades: Negra de la cruz, Bacon, Edranol y Hass, desde la última etapa de desarrollo hasta madurez fisiológica. Tesis Ing. Agr., Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Agronomía. 36 p.
- Feng, X., Apelbaum, A., Sisler, E.C., Goren, R.** (2000). Control of ethylene responses in avocado fruit with 1-methylcyclopropene. *Postharv. Biol. Technol.* 20: 143–150.
- Ferguson, I., Volz, R., Woolf, A.** (1999). Preharvest factor affecting physiological disorders of fruit. *Postharv. Biol. Technol.* 15: 255-262
- González-Agüero, M., Pavez, F. Ibáñez, I. Pacheco, R. Campos-Vargas, L.A. Meisel, A. Orellana, J. Retamales, H. Silva, M. González, V. Cambiazo.** (2008). Identification of woolliness response genes in peach fruit after postharvest treatments, *J. Exp. Bot.* 59: 1973-1986.
- Grillo, G., Turi, A., Licciulli, F., Mignone, F., Liuni, S., Banfi, S., Gennarino, A.G., Horner, D.S., Pavesi, G., Picardi, E., and Pesole, G.** (2009). UTRdb and UTRsite (Release 2010): a collection of sequence and regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Research.* Vol 38. Database issue D75-D80.

- Hardenburg, RE., Watada, AE., Wang, CY.** (1986). The commercial storage of fruit, vegetables, and florist and nursery stocks. US Dept Agr Handbk 66, Washington DC (EEUU).
- Harwood, J.L.** (1988). Fatty acid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 101-138.
- HersHKovitz, V., Saguy, S.I., and Pesis, E.** (2005). Postharvest application of 1-MCP to improve the quality of various avocado cultivars. *Postharvest Biol Technol.* 37: 252-264.
- Hofman, P.J., Jobin-Decor, M., Meiburg, G.F., Macnish, A.J., Joyce, D.C.** (2000). Ripening and quality responses of avocado, custard apple, mango and papaya fruit to 1-methylcyclopropene. *Aust. J. Exp. Agric.* 41: 567-572.
- Jeong, J., Huber, D.J., and Sargent, S.A.** (2002). Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell-wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea americana*) fruit. *Postharvest Biol Technol.* 25: 241-256.
- Jun Li, M., Xia, H., Zhao, C.Z., Li, A.Q., Li, C.S., Bi, Y.P., and Wan, S.B.** (2010). Isolation and Characterization of Putative Acetyl-Coa Carboxylase in *Arachis hypogaea* L. *Plant. Mol. Biol.* 28: 58-68.
- Kachroo, A. Kachroo, P.** (2009). Fatty acid-derived signals in plant defense. *Annual Review Phytopathology*, 47:153-176.
- Kader, A. and M.L., Arpaia.** (2002). Postharvest Technology. Department of Pomology, University of California, Davis. Disponible en <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Aguacate.shtml>. Leído el 13 de septiembre de 2009.
- Ke, J., Wen, T.N., Nikolau, B.J., and Wurtele, E.S.** (2000). Coordinate regulation of the nuclear and plastidic genes coding for the subunits of the heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physiol.* 122: 1057-1071,
- Kesari, R., Trivedi, P.K., Nath, P.** (2007). Ethylene-induced ripening in banana evokes expression of defense and stress related genes in fruit tissue. *Postharvest Biol. Technol.* 46: 136 -143.

- Kodama H, Horiguchi G, Nishiuchi T, Nishimura M, Iba K.** (1995). Fatty acid desaturation during chilling acclimation is one of the factor involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves. *Plant Physiol.* 109: 1177-1185.
- Kosiyachinda, S., y Young, RE.** (1976). Chilling sensitivity of avocado fruit at different stages of the respiratory climacteric. *J Amer Soc Hort Sci.* 101: 665-667.
- Knight Jr Rj.** (2002). History, distribution and uses. In : *The avocado: Botany, production and uses* (Eds., A.W. Whiley, B. Schaffer and B.N. Wolstenholme ), Publishing. 1:10.
- Kremer-Köhne, S. and Köhne, J.S.** (1992). Yield and fruit quality of fuerte and Hass on clonal rootstocks. *South African Avocado Growers Assn. Yrbk.* 15: 69.
- Lallu, N., Burdon, J., Haynes, G., Francis, K., Boldingh, H., Pak, H., Fields, F., Elmsly, T.A., Smith, D.B., Dixon, J., Cutting, J.G.M.** (2005). Is the poor quality of late season New Zealand 'Hass' avocado fruit related to fruit characteristics at harvest? *New Zealand Avocado Grower's Association Annual Research Report.* 5: 57-66.
- Lee, SH., Ahn, SJ., Im, YJ., Cho, K., Chung, GC., Chi, BH., y Han, O.** (2005). Differential impact of low temperature on fatty acid unsaturation and lipoxygenase activity in figleaf gourd and cucumber roots. *Biochem Biophys Res Commun.* 330: 1194-1198.
- Lee S.K., Young R.E.** (1993). Growth measurement as an indication of avocado fruit maturity. *J. Amer. Soc.Hort.Sci.* 108: 395-397.
- Lewis., C.E.** 1978. The maturity of avocados : a general review. *Journal Food Science* 39 : 857-866.
- Lieberman, M.** (1979). Biosynthesis and action of ethylene. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30: 533-591.
- Lindqvist Y, Huang W, Schneider G, Shanklin J.** (1996). Crystal structure de  $\Delta^9$  stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. *The embo journal.* 15: 4081-4092
- Lizana, L.A., Salas, M. y Berger, H.** (1992). The influence of harvest maturity, type of packing and temperaturas on avocado quality, p. 435-442. In: *Proc. Of Second World Avocado Congress, California.*

**Lurie, S., Laamin, M., Lapsker, Z., y Fallik, E.** (1997). Heat treatments to decrease chilling injury in tomato fruit. Effects on lipids, pericarp lesions and fungal growth. *Physiol Plant.* 100 : 297-302.

**Lurie, S.; Weksler, A.** (2004). Effects of 1-methylcyclopropene on stone fruits. In: International Postharvest Symposium, 5, Verona. **Abstracts.** Verona: The Italian Postharvest Working Group, 2004. pp 5.

**Luza, J.G., Berger, H. y Lizana, L.A.** (1979). Almacenaje en frío de paltas (*Persea americana\_Mill*) cvs. Negra La Cruz, Ampolleta Grande y Fuerte. *Simiente* 49:42-47.

**Lyons, J.M.** (1973). Chilling injury in plants. *Annu Rev Plant Physiol.* 24: 445-466.

**Marabolí, P.F. y Molinos, V.** (1987). Temperatura de almacenaje e inmersión en ethrel de paltas cv. Bacon. Tesis ing. Agr., Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 91p.

**Marangoni, AG., Palma, T., y Stanley, DW.** (1996). Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biol Technol.* 7: 193-217.

**Martinez-Romero D, Serrano M, Guillen F, Castillo S, Valero D.** (2007) Tools to maintain postharvest fruit and vegetable quality through the inhibition of ethylene action: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47:543–560

**Martins, E., Robaldinho, R. and Meneghini, R.** (1995). Oxidative stress induced activation of a cytosolic protein responsible for control of iron uptake. *Archives of Biochemistry and Biophysic* 316:128-134

**Mathooko, F.M., Tsunashima, Y., Kubo, Y., and Inaba, A.** (2004). Expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene in peach (*Prunus persica* L.) fruit in response to treatment with dioxide and 1-methylcyclopropene: posible role of ethylene. *African Journal of Biotechnology.* Vol. 3. pp. 497-502.

**Meneghini, R., Hoffmann Me., Duran, N., Faljoni, A. and Cilento, G.** (1978). DNA damage during the peroxidase-catalyzed aerobic oxidation of isobutanal. *Biochimica et Biophysica ACTA:* 518 177-180.

- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., and Pesole, G.** (2002). Untranslated region of mRNAs. *Genome Biol.*, 3, Reviews0004.1-0004.10.
- McGlasson, W.B., Scott, K.J., and Mendoza, D.B.** (1979). The refrigerated storage of tropical and subtropical products. *Int J Refrig.* 2: 199-206.
- Owino, W.O., Nakano, R., Kubo, Y., and Inaba, A.** (2002). Differential regulation of genes encoding ethylene biosynthesis enzyme and ethylene response sensor ortholog during ripening and in response to wounding in avocados. *J. Am. Hortic. Sci.* 127: 520-527.
- Ozdemir, F., Topuz, A.** (2003). Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. *Food Chemistry.* 86:79-83.
- Pantastico, EB., Grierson, W., y Soule, J.** (1967). Chilling injury in tropical fruits: I. Bananas (*Musa paradisiaca* var. *Sapientum* cv. Lacatan). *Proc Amer Soc Hort Sci.* 11: 83-91.
- Parkin, KL., Marangoni, A., Jackman, R., Yada, R., y Stanley, D.** (1989). Chilling injury. A review of possible mechanism. *J Food Chem.* 13: 127-153.
- Paul, R.E.** (1990). Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. In: C.Y. Wang (editor), *Chilling Injury of horticultural Crops*. CRC Press, Boca Raton, Fla., pp 22.
- Peralta, L.** (1977). Ensayos preliminares en almacenaje de palta Fuerte (*Persea americana* Mill.). Tesis Ing. Agr., Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Agronomía. 89 p.
- Pesis, E., Ackerman, M., Ben-Arie, R., Feygenberg, O., Feng, X., Apelbaum, A., Goren, R., Prusky, D.** (2002). Ethylene involvement in chilling injury symptoms of avocado during cold storage. *Postharv. Biol. Technol.* 24: 171-181.
- Phan-Thien K-Y, Wargo J.M., Mitchell L.W., Collett M.G., Rath A.C.** (2004). Delay in ripening of 'Gala' and 'Pink Lady' apples on commercial orchards following preharvest applications of aminoethoxyvinylglycine. *Aust J Exp Agric.* 44: 807-812
- Requejo-Tapia, L.C., Woolf, A.B., Roughan, G., Schroeder, R., Young, H., White, A.** (1999). Seasonal changes in lipid content and fatty acid composition of 'hass' avocados. *Avocado Postharvest Research: (1998/99).* pp 1-29.



- Reverdatto, S., Beilinson, V., and Nielsen, N.C.** 1999. A Multisubunit Acetyl Coenzyme A Carboxylase from Soybean. *Plant Physiol.* Vol. 119. pp. 971-978.
- Roesler K.R., Shorrosh B.S., Ohlrogge J.B.** (1994). Structure and expression of an Arabidopsis acetyl-coenzyme A carboxylase gene. *Plant Physiol.* 105: 611–617
- Rhodes, M.J.C.** (1981). The maturation and ripening of fruits. In "Senescence in Plants" (K. V. Thimann, ed.). CRC Press, Boca Raton. pp 157–205
- Salas, J.J, Sanchez, J., Ramli, U.S., Manaf, A.M., Williams, M., and Harwood, J.L.** (2000). Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. *Progress in Lipid Research.* 39: 151-180
- Sambrook J, Fritsch EF, Miniatis T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor. pp 132-134
- Sasaki, Y., Hakamada, K., Suama, Y., Nagano, Y., Furusawa, I. and Matsuno, R.** (1993) Chloroplast-encoded protein as a subunit of acetyl-Coa carboxylase in pea plant. *J Biol Chem.* 268: 25118-25123
- Sasaki, Y., Nagano, Y.** (2004). Plant Acetyl-Coa Carboxylase : Structure, Biosynthesis, Regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Biosci Biotechnol Biochem.* 68 : 1175-1184.
- Sisler, E.C., Alwan, T., Goren, R., Serek, M., and Apelbaum, A.** (2003). 1-Substituted cyclopropenes: Effective blocking agents for ethylene action on plants. *Plant Growth Regulation.* 40: 223-228.
- Sun, J., Ke, J., Johnson, J. L., Nikolau, B. J, and Wurtele, E. S.** (1997). Biochemical and Molecular Biological Characterization of CAC2, the Arabidopsis thaliana Gene Coding for the Biotin Carboxylase Subunit of the Plastidic Acetyl-Coenzyme A Carboxylase. *Plant Physiol.* 115: 1371-1383.
- Schröder, G., Brown, J., Schröder.** (1988). Molecular analysis of revestarol synthase: cDNA genomic clones and relationship with chalcone synthase. *Eur J Biochem.* 172: 161–169

**Schwartz, M, Olaeta, J.A., Undurraga, P. y Costa V.** (2007). Mejoramiento del rendimiento de extracción de aceite de Palta (Aguacate). Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate) Viña del mar, Chile. ISBN N° 978-956-17-0413-8

**Shewfelt, RL., y Erickson, ME.** (1991). Role of lipid peroxidation in the mechanism of membrane-associated disorders in edible plant tissue. Trends Food Sci Technol. 2: 152-154.

**Slabas, A.R., White, A., O'Hara, P., Fawcett, T.** (2002). Investigation into the regulation of lipid biosynthesis in *Brassica napus* using antisense down-regulation. Biochem. Soc. Tran. 30: 1056-1059.

**Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150: 76-85.

**Snowdon, A.L.** (1990). A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables, Vol. 1. Wolfe Scientific, London. pp 102-103.

**Swarts, D.H.** 1984. Post harvest problems of avocados-let's talk the same language. S.Afr. Avocado Grow. Assn. Yrb. 7:15-19.

**Tasseva G, Davy de Virville J, Cantrel C, Moreau F, Zachowski A .** (2004). Changes in the endoplasmic reticulum lipid properties in response to low temperature in *Brassica napus*. Plant Physiology and Biochemistry. 42: 811-822

**Undurraga, P., J.A. Olaeta, G. Opazo.** (2003). Caracterización histológica y bioquímica de desórdenes fisiológicos en paltas (*Persea americana* Mill.) cv. Hass en almacenaje refrigerado, en dos estados de madurez. Actas V Congreso Mundial del Aguacate. 19-24 Octubre 2003. Málaga España. Vol II pag 653-657

**Van Lelyveld, L.J. and Bower, J.P.** 1984. Enzyme reactions leading to avocado mesocarp discoloration. J. Hort. Sci. 59:257-263.

**Wan, C.Y., Wilkins., T.A.** (1994). A modified hot borate method significantly enhances the yield of quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.), Anal. Biochem. 223: 7-12.

**Watkins, C.B.** (2002). Ethylene synthesis, mode of action, consequences and control. In : M. Knee (ed.). Fruit quality and its biological basis. CRC Press, Boca Raton, Fla. P. 180-224.

**Wills, R. H., Lee, T. F., Graham, D., Me glasson, W. B. and Hall, E. G.** (1981). Post Harvest. An introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables. New South Wales University Press Limited, Australia. 153 p.

**Wolfe, J.** (1978). Chilling injury in plant- The role of membrane lipid fluidity. Plant. Cell and Envir. 1: 241-247.

**Woolf, A.B., Requejo-Tapia, C., Cox, K.A., Jackman, R.C., Gunson, A., Arpaia, M.L., White, A.** (2004). 1-MCP reduces physiological storage disorders of 'Hass' avocados. Postharv Biol. Technol. 35: 43-60.

**Wolf R.B., Cavins J.F., Kleiman R., Black L.T** (1982). Effect of temperature on soybean seed constituents: oil, protein, moisture, fatty acids, amino acids. J Am Oil Chem Soc. 59: 230-232

**Yu Y-B, Adams DO, Yang SF.** (1979). 1-aminocyclopropanecarboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. Arch Biochem Biophys. 198:280

**Zamorano, P.J, Dopico, B., Lowe, L.A., Wilson, D.I., Grierson, D., Merodio, C.** (1994). Effect Low temperatura storage and ethylene on ripening and gene expression changes in avocado fruit. Postharv. Biol. Technol. 4: 331-342.

**Zauberman, G.; Schiffmann-Nadel, M.; Yanko, U.** (1977): The response of avocado fruits to different storage temperatures. HortScience. 12: 353-354.

**Zauberman, G., Fuchs, y. and Akerman, M.** 1985. Peroxidase activity in avocado frut stored at chilling temperatures. Sci. Hort. 26:261-255.

**Zentmeyer, G.A.** (1987). Avocados around the World. Calif. Avoc.Soc.Yrb. 71: 63-77