

PROYECTO ESPECÍFICO

Estrategias para la diferenciación de alimentos y el desarrollo de nuevos productos alimentarios.

PROYECTO INTEGRADOR Optimización de calidad integral y otras estrategias de agregado de valor.

ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS DE ESTRÉS TÉRMICO (HSPs) COMO INDICADOR BIOQUÍMICO DE DAÑO POSCOSECHA EN MANDARINAS SATSUMA OKITSU

V. Ambrosi¹, F. Bello², M. Nanni^{1,3}, D. Vazquez², S. Guidi^{1,3}¹Instituto de Tecnología de Alimentos. CIA. INTA. CC77B1708WAB, Morón, Bs. As., Argentina.²Estación experimental Concordia. INTA. Estación Yuquerí Casilla de Correo 34, Concordia, Entre Ríos, Argentina.³Facultad de Agronomía y Cs Agroalimentarias. Universidad de Morón. Cabildo 134, Morón, Bs. As., Argentina.Correo electrónico: guidi.silvina@inta.gob.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión de las HSPs en mandarinas Satsuma Okitsu con diferentes índices de color (IC) a cosecha sometidos a tratamiento de desverdizado y posterior conservación frigorífica, como posible indicador bioquímico de alteraciones fisiológicas. Se cosecharon dos lotes de frutos (Entre Ríos) con índices de color de -12,8 y -9,6, ambos con grado de madurez adecuados para su consumo en fresco. Estos lotes fueron sometidos a tratamiento de desverdizado (1-3 ppm etileno, 72h a 21°C), seguido de descanso (21°C 72 hs, 95% HR) y posterior conservación (30 días a 5°C) y 7 días a 20°C simulando la etapa de comercialización. El análisis se realizó a través de la expresión dos familias de HSPs: 1) la familia de HSP de bajo peso molecular (sHSPs), y 2) la familia de HSP de 70 kDa (HSP70). Se extrajeron las proteínas del flavedo de los frutos utilizando fenol bufferado. Ochenta microgramos (80 µg) de proteínas totales fueron separadas mediante SDS-PAGE y posteriormente analizadas inmunológicamente mediante la técnica de Western blot. A nivel de Western blot, el anti-HSPC1 (sHSPs) inmunoreaccionó con tres bandas proteicas con peso molecular de aprox. 22- 23, 18 y 16 kDa, en ambos lotes de frutas analizados (IC: -12,8 y -9,6). Para el lote con IC -9,6, se observaron diferencias de nivel de expresión de las proteínas de 18 y 16 kDa entre el control y los 30 días de conservación frigorífica. Respecto al lote con IC -12,8, no hubo cambios en la expresión de estas dos proteínas. Por otra parte, el anticuerpo anti-HSP70 sólo inmunoreaccionó en las muestras pertenecientes al lote con menor índice de color (-12,8), dando una única banda de 70 kDa, tanto para la muestra control como para la de 30 días de conservación frigorífica. A partir de estos resultados preliminares podríamos inferir que la expresión diferencial de las HSPs podría ser herramienta para predecir posibles alteraciones fisiológicas que minimicen las pérdidas comerciales provocadas por manchas que pudieran ocasionar el desverdizado y su posterior conservación en frío.

Palabras clave: mandarina, HSPs, desverdizado, calidad

ABSTRACT

The aim of the present work was evaluate the expression of HSPs in Satsuma Okitsu mandarins in two batches of fruits with different color indexes (CI) at harvest, and subjected to degreening treatment and subsequent refrigeration conservation, as a possible biochemical indicator of physiological alterations. Two batches of fruits (Entre Ríos) were harvested with color indexes of -12.8 and -9.6, both with adequate degree of maturity for the external market. These batches were subjected to degreening treatment (1-3 ppm ethylene, 72h at 21 °C), followed by rest (72hs at 21 °C, 95% RH) and subsequent storage (30 days at 5 °C) and 7 days at 21 °C simulating the marketing stage. The analysis was carried out through the expression of two families of HSPs: 1) the family of HSPs of low molecular weight (sHSPs) and 2) the family of HSP of 70 kDa (HSP70). Proteins (flavedo) were extracted from fruits using buffered phenol. Eighty micrograms (80 µg) of total proteins were separated by SDS-PAGE and subsequently analyzed immunologically by the Western blot technique. At the Western blot level, the anti-HSPC1 (sHSPs) immunoreacted with three protein bands with molecular weight of approx. 22-23, 18 and 16 kDa, in both batches of fruits analyzed (CI: -12.8 and -9.6). For the batch with IC -9.6, differences in the expression level of the 18 and 16 kDa proteins were observed between the control and the 30 days of refrigerated storage. Regarding the batch with IC -12.8, there were no changes in the expression of these two proteins. On the other hand, the anti-HSP70 antibody only immunoreacted in the samples belonging

to the batch with the lowest color index (-12.8), giving a single band of 70 kDa, both control and for the 30-day refrigerated conservation samples. From the results obtained we can conclude that the differential expression of the HSPs could be used as a tool to define the management of the fruit, minimizing the commercial losses caused by degreening and cold storage.

Keywords: mandarin, HSPs, degreening, quality.

INTRODUCCIÓN

A nivel nacional, los frutos cítricos representan el grupo de mayor importancia en volumen de producción. Se producen 2,8 millones de toneladas de frutas cítricas, ocupando el décimo lugar en la producción mundial (1). La citricultura en el NEA es una de las principales actividades económicas de la región. En Entre Ríos la superficie plantada es de casi 42.000 ha, estimándose que la superficie manejada por un productor es de 15–16 ha. Las especies más plantadas son naranjas y mandarinas destinadas fundamentalmente al consumo en fresco tanto en el mercado interno como de exportación.

El manipuleo de cítricos en el empaque y posterior almacenamiento puede llevar a alteraciones fisiológicas, no siempre de clara identificación, que afecten su calidad como fruta fresca. La calidad de los cítricos es relevante para el consumidor al momento de decidir la compra, donde aspectos como el color, la textura y el sabor, son los que influyen a la hora de su elección.

Luego de la cosecha y durante el acondicionamiento y almacenamiento, los frutos frescos son susceptibles de sufrir alteraciones patológicas y fisiológicas, con las consiguientes pérdidas en cantidad y calidad. A modo de ejemplo se mencionan los daños asociados al desverdizado de variedades cítricas de maduración temprana. Esta técnica permite comercializar fruta en momentos óptimos de mercado, una fruta que si bien ha alcanzado su madurez interna pero cuya cáscara presenta colores pálidos, poco atractivos al consumidor (2). El desverdizado es una técnica poscosecha mediante la cual se acelera la degradación de los pigmentos de color verde (clorofila) de la cáscara de los frutos manifestándose la coloración proporcionada por los pigmentos carotenoides (naranja) cuya síntesis puede ser, a su vez, acelerada en el proceso (3, 4). En el proceso de desverdizado, se aplica etileno exógeno, sometiendo a los cítricos a condiciones de estrés que pueden llevar alteraciones fisiológicas. Concentraciones de etileno tan bajas como 1 ppm tienen un efecto constatable en el desverdizado, no aconsejándose sobrepasar las 10 ppm dado que mayores concentraciones no producen una mayor velocidad de desverdizado. Por el contrario ocasionan una aceleración de otros procesos metabólicos tales como la respiración, la desecación y caída de cálices, y los que conducen al ablandamiento de la piel (5).

La conservación frigorífica es considerada el método más efectivo para preservar la calidad en poscosecha de frutas, debido a que retarda el envejecimiento, disminuye la respiración, las podredumbres y los cambios metabólicos indeseables. Es por ello que esta técnica es cada vez más utilizada para alargar el período de comercialización de cada variedad y mantener la calidad durante el transporte a mercados distantes (6). En el NEA, la temperatura utilizada para la conservación de naranjas y mandarinas es de alrededor de 5°C (7).

Si bien existen recomendaciones prácticas para reducir los daños asociados a los procesos de desverdizado y conservación frigorífica (momento de cosecha, temperatura, humedad relativa, concentración de gases, etc.), no se conocen los mecanismos moleculares y bioquímicos asociados a estas alteraciones que presentan los frutos.

Existen numerosos datos experimentales que sugieren que las proteínas de estrés térmico (HSPs) juegan un papel crucial en la protección de las plantas frente a diferentes situaciones de estrés. En los últimos años se han llevado a cabo investigaciones donde se las utiliza con fines prácticos. Dado que los cambios producidos a nivel bioquímico constituyen las primeras respuestas detectables frente a las fluctuaciones ambientales, la detección y/o cuantificación de las HSPs podrían ser utilizadas con fines de biomonitorio de las diferentes situaciones a la que las frutas están expuestas (8).

El objetivo del presente trabajo es generar conocimientos sobre los procesos bioquímicos asociados a la aplicación de los tratamientos poscosecha en frutos cítricos, lo cual permitirá tomar decisiones en cuanto a alternativas de manejo poscosecha de la fruta, y acceder a los mercados con productos finales de calidad óptima.

MATERIALES Y MÉTODOS

Frutos

Se utilizaron frutos de mandarinas Satsuma (*Citrus unshiu*, cv. 'Okitsu') provenientes de quintas de productores del departamento de Federación, Entre Ríos (2013). Las mandarinas fueron transportadas al laboratorio de

postcosecha de la Estación Experimental Concordia del INTA, donde se seleccionaron y clasificaron frutos homogéneos y libres de daños superficiales. Se definieron dos lotes (1 y 2) que se diferenciaron en el índice de color inicial: -12,8 y -9,6 (Minolta, Sistema Hunter-Lab). Ambos lotes presentaban grado de madurez adecuados para su consumo en fresco (medido por el índice de madurez y porcentaje de jugo). Cada tratamiento consistió en cuatro réplicas de 30 frutos cada uno, de los cuales en tres réplicas se utilizaron para el recuento de alteraciones, pérdida de peso y color, mientras que la restante se destinó para determinar calidad interna. Al iniciar el ensayo se tomaron al azar 15 frutos por lote a los cuales se les determinó el índice de color y el peso. Cada lote de mandarinas fue sometido a tratamiento de desverdizado: fueron colocados en un ambiente con 1-3 ppm de etileno, $21 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y $90 \pm 1\%$ HR por un periodo de 72 horas. Seguidamente, se dejó descansar por un período similar sin la aplicación de etileno y manteniendo las demás condiciones constantes. Luego, las mandarinas fueron procesadas en una línea de empaque semicomercial. Las mandarinas fueron almacenadas 30 días en cámara de conservación con una temperatura de $5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y $90 \pm 1\%$ HR, y luego expuestas por 7 días a $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, simulando las condiciones de comercialización (Figura 1).

Análisis de calidad

Se determinó el color por medio del Índice de Color $\text{IC} = 1000a/Lb$ (9), con colorímetro triestímulo Minolta modelo CR-300. Para cada fruto se realizaron dos determinaciones en su parte ecuatorial y en puntos equidistantes. La pérdida de peso fue determinada como porcentaje con respecto al peso inicial, se utilizó para ello una balanza Sartorius, modelo LC 1200S. La calidad interna de los frutos se evaluó sobre tres muestras de cinco frutos por tratamiento. El porcentaje de jugo se determinó mediante extracción manual del jugo de tres repeticiones de cinco frutos por cada réplica, como el cociente del volumen (ml) y el peso (g) expresándolo en forma porcentual. Los sólidos solubles se determinaron en el jugo obtenido de cada réplica, se utilizó un refractómetro digital Atago modelo PocketPAL-1, y se expresó como porcentaje de sólidos disueltos. La acidez se midió por titulación volumétrica del jugo obtenido de tres réplicas de cinco frutos. Se utilizó hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador y expresando el resultado como mg de ácido cítrico en 100ml de jugo. El índice de madurez se calculó como el cociente entre los sólidos solubles y la acidez.

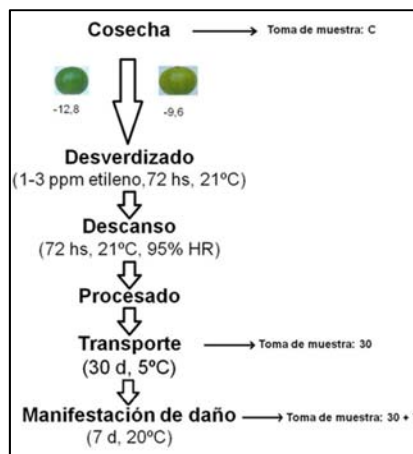


Figura 1. Esquema del tratamiento de desverdizado aplicado a ambos lotes de frutos de mandarina (IC de -12,8 y -9,6)

Extracción de proteínas

Las proteínas fueron extraídas a partir del pericarpio (cáscara coloreada) de los frutos, según el método de Hurkman y Tanaka (10), con algunas modificaciones. Previamente, el tejido vegetal fue pulverizado con nitrógeno líquido. Se tomó 1g de material vegetal al cual se le adicionó 2 ml de buffer de extracción para proteínas (BPE) y 5 ml de fenol saturado en 100mM de buffer Tris-HCl pH 8.0 conteniendo EDTA 1mM. El preparado se homogeneizó con equipo Ultraturrax. El homogenato así obtenido, se dejó reposar en heladera durante 15 min, y posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 2314 x g durante 30 min a 4 °C, en una

centrífuga Sorvall RC3C. Se extrajo la fase fenólica, a la cual se le adicionó un volumen equivalente de buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 conteniendo EDTA 1mM. Se agitó y posteriormente la muestra se centrifugó durante 30 min a 2314 x g y 4 °C. Se separó la fase fenólica y se le adicionó acetato de amonio 0.1 M en metanol, en relación 1:5. Las muestras se mantuvieron en freezer a -20 °C durante toda la noche. Posteriormente, las proteínas fueron centrifugadas durante 30 min a 10000 x g en la centrífuga Sigma 3K30. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con acetato de amonio 0.1M en metanol, y posteriormente con acetona al 80%, centrifugándose cada vez (2 veces) a 12000 x g durante 1 min. El precipitado una vez seco, se resuspendió en 100 µl en buffer de corrida para electroforesis (BCE).

BPE: Tris-HCl 100mM pH 8,0, EDTA 1mM pH 8,0, PMSF (fluoruro de fenimetanosulfonilo) 1mM; **BCE:** Tris- HCl 0.625 M pH=6.8; 10 % (v/v) glicerol; 2% (p/v) SDS: 2 % (v/v) 2-mercaptoetanol y 0.02 (p/v) de azul de bromofenol.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de las proteínas fue determinada por el método de Lowry (11) utilizando como patrón una solución de seroalbúmina bovina (BSA) 0.2 mg/ml. La absorbancia de las muestras fue medida a una longitud de onda de 660 nm en un espectrofotómetro METROLAB 330.

Separación e identificación de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Las corridas electroforéticas fueron realizadas según la técnica de Laemmli (12) en geles de 0,75 mm de espesor. Se sembró 80 µg de proteínas en cada una de las calles de los geles. Las proteínas fueron separadas utilizando geles discontinuos; la concentración de poliacrilamida del gel separador fue del 12,5 %. Las corridas electroforéticas fueron realizadas con un equipo Mini Protean II (BIO-RAD®) a voltaje constante (130V) durante aproximadamente 1 h 30 min. Como estándar de peso molecular se utilizó para el SDS-PAGE el estándar de bajo peso molecular (PM) de BIO-RAD®, en el cual las proteínas estuvieron comprendidos en el rango de 14.4 - 97.4 kDa, mientras que para el western blot, se utilizó el estándar Prestained Protein Ladder (Thermo) con proteínas comprendidas entre 10 a 170kDa. Posteriormente, las bandas proteicas fueron teñidas con una solución al 0,2% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue R-250 en solución de acético/metanol/agua (v/v) (10/45/45).

Identificación de proteínas por métodos inmunológicos

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas durante 50 min a 100 V y 350 mA, a una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro: 45µm) utilizando el buffer de transferencia (BT) y el módulo de transferencia del Mini Protean II (BIO-RAD®). Una vez finalizada la transferencia, la membrana fue lavada durante 15 min con una solución Tris buffer salino (TBS) conteniendo Tween 20 (TBST), y posteriormente bloqueada durante 30 min a 20 °C con solución de bloqueo (SB). A continuación, la membrana fue incubada durante 90 min a TA con el anticuerpo primario: antisuero policlonal anti-HSP21, diluido 1:750 en TBST + leche en polvo descremada 2%; o con el anticuerpo monoclonal comercial anti-HSP70 (SIGMA®, catálogo # H5147, monoclonal anti-heat shock protein 70 clone BRM-22) diluido 1:1500 en TBST + 2% leche en polvo descremada. Luego del lavado durante 15 min con solución TBST, la membrana fue incubada durante otros 90 min a TA con el anticuerpo secundario [anti- IgG ratón para el caso de anti-HSP70, o anti- IgG conejo para el caso de anti-HSP21, obtenidos ambos en cabra y conjugados con fosfatasa alcalina (KPL) en una dilución 1:10000]. Luego de tres lavados de 5 min cada uno con TBST, la membrana fue revelada con solución reveladora (SR) hasta visualización de las bandas (13). Las bandas obtenidas en los geles de poliacrilamida y en las membranas de nitrocelulosa fueron escaneadas con un Densitómetro GS-800 ImagingCalibratedDensitometer (BIO RAD®), y las imágenes así obtenidas fueron digitalizadas y procesadas posteriormente mediante el programa de análisis QuantityOne 1-D (BIO-RAD®), para determinar los PM y las cantidades relativas de las proteínas presentes en las bandas de interés.

BT: 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina, 20% metanol y 0.4% SDS; **TBS:** 25 mM Tris-HCl pH 7.4, NaCl 0,8%, KCl 0.02%; **TBST:** 0.05% (v/v) Tween 20 en TBS; **SB:** TBST conteniendo 2 % de leche en polvo descremada; **SR:** 0.4 mMnitrobluetetrazoliumchloride (NBT) + 0.4 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfato (BCIP) en buffer de desarrollo (BD); **BD:** 100 mM Tris pH 9.5; 0.5 mM MgCl₂

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1, se observan las variables de calidad iniciales, obtenidos para ambos lotes de frutas analizadas con diferente índice de color.

Tabla 1. Calidad interna de mandarinas en la cosecha

Parámetro analizado	Lote con fruta más verde	Lote con fruta menos verde
IC	-12.80	-9.60
Peso (g)	100.3	140.9
% Jugo	41.5	42.0
°Brix	9.80	9.10
Acidez	0.98	0.73
IM	10.0	12.4

En cuanto a las variables fisiológicas analizadas, en general no se vieron grandes diferencias. Lo más destacable fue que la fruta proveniente del lote más verde presentó mayores valores de acidez, y por ende un menor IM. Al cabo de 30 días de conservación, se observó que la fruta con menor índice de color (-12.8), presentaba frutas con manchas (Tabla 2), mientras que esta alteración no fue observada en la fruta más coloreada.

Tabla 2. Porcentaje de frutos con manchas

% de Fruta manchada	30 días de conservación	
	Lote con fruta más verde (-12.8)	Lote con fruta menos verde (-9.6)
	2.2	0

La figura 2 muestra el análisis electroforético de las muestras de mandarinas sometidos al tratamiento de desverdizado, para ambos lotes con diferente IC. En la fruta más verde (-12.8; izquierda de la imagen), se observa una banda proteica de alta densidad de 26-27 kDa y otras cuatro bandas de menor intensidad de PM aproximados de 52 kDa, 40 kDa, 31 kDa y 27.5 kDa, tanto en la cosecha (c), como durante la conservación frigorífica (30 y 30+7). Para cada banda proteica, no se observó diferencia de intensidad durante todo el período analizado. En la zona de bajo PM en esta figura también se observa una banda tenue de 21.7kDa solamente en las muestras proteicas correspondiente al tratamiento de desverdizado (30 y 30+7), no siendo detectable en la cosecha (c). Respecto de las proteínas de alto PM (70 kDa) no fue posible visualizar estas proteínas. En el gel donde se sembró las muestras correspondientes a la fruta llamada menos verdes (-9.6, derecha de la imagen) se observa solamente en forma notoria la banda proteica de 26-27kDa de PM, en todos los períodos analizados (c, 30 y 30+7). En forma tenue se observa una banda proteica de 40 kDa, también en todos los períodos analizados (c, 30 y 30+7). Por su parte, no fue posible detectar las bandas de 52 kDa, 31 kDa y 27.5 kDa vistas en la fruta con menor índice de color. Tampoco se detectaron proteínas de alto PM (70 kDa).

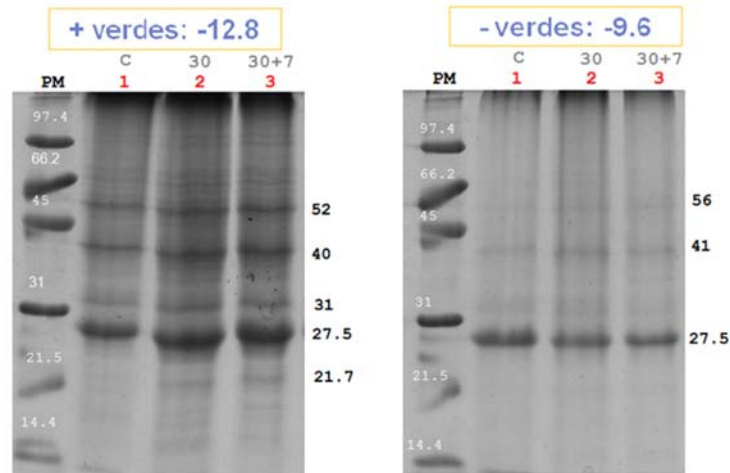


Figura 2. Análisis por SDS- PAGE de los extractos proteicos de mandarinas, sometidos al tratamiento de desverdizado.

Los frutos fueron analizados en la cosecha (c), a los 30 días de conservación frigorífica (30) y luego de la simulación del período de comercialización (30+7), para ambos lotes con diferente IC

Con el propósito de corroborar los resultados obtenidos en cuanto a si las bandas proteicas corresponde o no a algún miembro de las HSPs, los extractos proteicos fueron posteriormente analizados por la técnica de Western blot (figura 3).

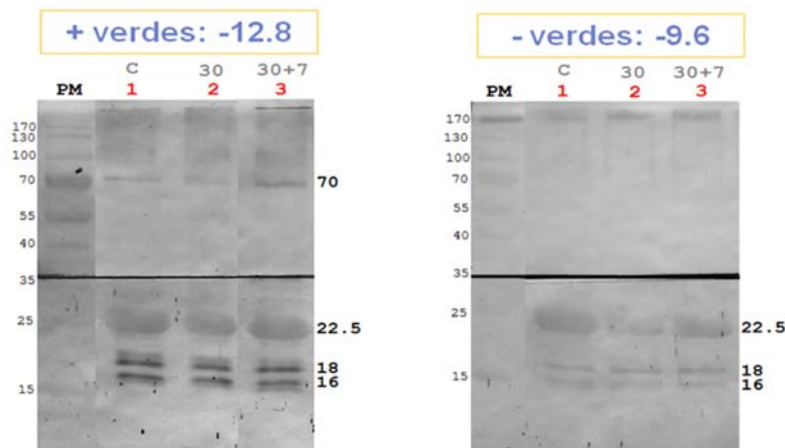


Figura 3. Análisis por *Western Blot* de los extractos proteicos de mandarinas, sometidos al tratamiento de desverdizado.

Los frutos fueron analizados en la cosecha (c), a los 30 días de conservación frigorífica (30) y luego de la simulación del período de comercialización (30+7), para ambos lotes con diferente IC

La figura 3 muestra el análisis inmunológico de las muestras de mandarinas sometidos al tratamiento de desverdizado, para ambos lotes con diferente IC. Cada membrana fue dividida a la mitad. La parte superior

muestra los resultados correspondientes al incubarla con el anticuerpo anti HSP70, mientras la mitad inferior corresponde al antisuero anti-HSPC1 (21 kDa).

En la fruta más verde (-12.8; izquierda de la imagen), puede observarse que el anticuerpo anti-HSP70 sólo inmunoreaccionó con una única banda proteica, estimada en 70 kDa por comparación con el patrón de referencia, tanto para la muestra control (c) como para las muestras conservadas durante 30 días, y su posterior exposición de 7 días a 20 °C (30 y 30+7). Estos resultados permiten deducir que la banda proteica corresponde a un miembro de la familia de las HSP70 (estimado por el PM y reacción con el anti-HSP70 monoclonal). Por su parte, el anti-HSPC1 inmunoreaccionó con tres bandas proteicas de PM 22-23kDa, 18 kDa y 16 kDa. La evaluación semicuantitativa por densitometría óptica de la intensidad de las bandas permitió establecer que las intensidades de dichas bandas fueron similares durante todo el período analizado (dato no mostrado).

Respecto de la fruta menos verde (-9.6; imagen de la derecha), el anticuerpo anti-HSP70 no pudo detectar la banda correspondiente; y respecto del anticuerpo de bajo PM, éste inmunoreaccionó también con las mismas proteínas que en la fruta más verde (22-23, 18 y 16 kDa, respectivamente) tanto en el control como durante la conservación frigorífica (30 y 30+7).

El estudio del perfil proteico de los extractos de los frutos sometidos a diferentes tratamientos es considerado de gran importancia, ya que suministra información acerca de los posibles cambios bioquímicos inducidos por la aplicación de los mismos y permite de esta manera, establecer el mecanismo asociado al efecto ejercido por el tratamiento.

El análisis por SDS PAGE y Western blot permitió detectar proteínas cuyos PM estuvieron comprendidas en el rango de los 21-30 kDa. Es importante destacar que en ambos lotes de frutas, ya sea en la cosecha como durante la conservación, se detectó una banda de intensidad significativa de 23-27 kDa, sugiriendo esta situación que podría corresponder a una proteína que se está expresando en forma conservativa. Asimismo, las bandas de 16 y 18 kDa también corresponderían a miembros de la familia de las sHSPs. Según Vierling (14) en vegetales las proteínas de bajo PM (sHSPs) serían las más importantes desde el punto de vista funcional, actuando como chaperonas moleculares. Estas proteínas tendrían precisamente la función de proteger a los frutos preservando, por un lado, estructuras específicas como las membranas y por otro lado, la función de proteínas específicas (15). Es sabido que estas proteínas son sintetizadas en respuesta a un amplio rango de situaciones, como el frío, UV, baja concentración de oxígeno, contaminantes químicos, salinidad, daño mecánico etc. (16, 17).

En cuanto a las HSP70, se detectó una única banda proteica en la fruta con el menor índice de color, tanto en la cosecha como durante la conservación frigorífica. Estos resultados estarían sugiriendo que se trataría de proteínas que se están expresando en forma constitutiva. Se sabe que los miembros de esta familia pueden expresarse tanto en forma constitutiva (llamadas HSC70) como en forma inducible (HSP70) (18). Las Hsp70, en casi todos los organismos, funcionan también como chaperonas, previniendo la agregación, y asistiendo en el plegamiento y desplegamiento de proteínas para prevenir su acumulación como agregados, y pliegues de forma adecuada durante su transferencia a su ubicación final (19).

CONCLUSIONES

Los ensayos realizados en este trabajo indican que las condiciones a las cuales se someten la fruta durante el proceso de desverdizado y almacenamiento, puede alterar significativamente la calidad de los frutos. También debe tenerse en cuenta el grado de coloración de la fruta al momento de la cosecha, cuando se la somete a un tratamiento de desverdizado. En este trabajo pudo observarse que los frutos, si bien presentaban condiciones de madurez adecuadas al momento de la cosecha salvo un IC más verde, luego de ser desverdizados manifestaron daño superficial más o menos extenso de color pardo oscuro. Este daño pudo detectarse a los 30 días de conservación con un recuento del 2%. Coincidentemente, en este lote (IC = -12.8) pudo identificarse la expresión de una banda proteica de 70kDa, tanto en la cosecha como luego de 30 días de conservación frigorífica, y aún en mayor medida, en las muestras que representaban el período de comercialización (30 + 7 días). A partir de los resultados obtenidos del estudio y caracterización de ambas familias de HSPs en muestras de frutos de mandarinas evaluados en poscosecha, se podría inferir que la expresión diferencial de estas proteínas podría ser utilizada como una herramienta para definir el manejo posterior de la fruta, minimizando las pérdidas comerciales provocadas por manchas que pudieran ocasionar el desverdizado y la conservación en frío, con menor pérdida comercial por parte de los productores de frutas de la zona.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece los aportes realizados por el Proyecto Específico No. 1130043 “Estrategias para la Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios” PNAIyAV-INTA, para realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

1. FEDERCITRUS: La actividad citrícola argentina. (2014). p17. www.federcitrus.org [14/08/14].
2. Meier, G.; Cocco, M.; Vázquez, D. (2008). Desverdizado de frutos cítricos. Experiencias en naranjas y mandarinas. Serie de Extensión N°3. Ediciones INTA, p. 26.
3. Jiménez Cuesta, M.; Cuquerella, J.; Martínez Jávega, J.M. (1983). Teoría y práctica de la desverdización de cítricos. Hoja Técnica INIA N° 46, p. 22.
4. Agustí, M. (2000). Citricultura. Ediciones Mundi Prensa, p. 416.
5. Cuquerella, J.; Navarro, P.; Salvador, A. (1999). Respuesta a la desverdización de nuevas variedades de cítricos. Levante Agrícola Especial Postcosecha N° 348, 263-271.
6. Manual Poscosecha de cítricos (2015). Coordinadores: D. Vázquez, G. Torres Leal, A. Yommi, R. Murray. ISBN N° 978-987-521-620-4. Ediciones INTA., 72 p
7. Vázquez, D.; Meier, G.; Cocco, M. (2005). Evaluación de la combinación de alternativas a fungicidas tradicionales en postcosecha de cítricos. En: Libro de Resúmenes XXII Congreso Latinoamericano y XXVIII Congreso Argentino de Horticultura. Gral. Roca, Río Negro. p. 128.
8. Bierkens, J.G.E.A. (2000). Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. Toxicology, 135: 61-72.
9. Jiménez Cuesta, M.; Cuquerella, J.; Martínez Jávega, J.M. (1981). Determination of a color index for citrus fruit degreening. En: Proc. Int. Soc. Citriculture, Tokio, Japón. 2:750-752.
10. Hurkman, W.; Tanaka, C. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. Plant Physiol., 81: 802-806.
11. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
12. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-684.
13. Stott, D.I. (1989). Immunoblotting and dot blotting. J. Immunol. Methods, 119 (2): 153-187.
14. Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. Annu. Rev. Plant. Physiol. and Plant Mol. Biol., 42: 579-620.
15. Brodl, M.R. (1989). Regulation of the synthesis of the normal cellular proteins during heat shock. Physiologia Plantarum, 75: 439-443. 1989
16. Hamilton III, E.W., Coleman, J.S. (2001). Heat-shock proteins are induced in unstressed leaves of *Nicotiana attenuata* (Solanacea) when distant leaves are stressed. Am. J. Bot., 88(5): 950-955.
17. Polenta, G.A. (2005). Tesis Doctoral. Aspectos fisiológicos y bioquímicos del uso de tratamientos de estrés para mejorar la conservación de frutas. FFyB, UBA.
18. Ritenour, M.; Kochhar, S.; Schrade, L.; Tsui-Ping, H., Ku, M. (2001). Characterization of heat shock expression in apple peel under field and laboratory condition. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 126(5): 564-570.
19. Sung, D.Y.; Vierling, E.; Guy, C.L. (2001). Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis HSP70 gene family. Plant Physiology, 126: 789-800.