



# **Avances en poscosecha de frutas y hortalizas**

I. Recasens, J. Graell, G. Echeverría  
(editores)



Edicions de la Universitat de Lleida  
Lleida, 2012





**DL:** L-1.128-2012  
**ISBN:** 978-84-695-4683-3

© Edicions de la Universitat de Lleida, 2012  
© del texto: los autores

**Maquetación:** Edicions i Publicacions de la UdL  
**Diseño de portada:** La Gràfica

**Impresión:** Service Point



A continuación se relacionan unas erratas detectadas en el libro *Avances en Poscosecha de Frutas y Hortalizas*, I. Recasens, J. Graell, G. Echeverría (Editores), Edicions de la Universitat de Lleida (ISBN: 978-84-695-4683-3).

Además, se presentan 2 nuevos capítulos que por error no aparecieron en el citado libro:

- Biomarcadores de tolerancia a bajas temperaturas activados por altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, de los autores: O. Goñi, M.T. Sanchez-Ballesta, C. Merodio y M.I. Escribano
- Daños por frío en fruto de calabacín (*Cucurbita pepo* L.): comparativa de zonas dañadas y sanas de exocarpo, de los autores: V. López-Cadenas, F. Carvajal, M. Jamilena y D. Garrido

# Biomarcadores de tolerancia a bajas temperaturas activados por altas concentraciones de CO<sub>2</sub>

O. Goñi<sup>1</sup>, M.T. Sanchez-Ballesta<sup>1</sup>, C. Merodio<sup>1</sup> y M.I. Escribano<sup>1</sup>

## RESUMEN

La tolerancia al daño por frío viene determinada principalmente por la capacidad para evitar alteraciones en la estructura y conformación de las membranas celulares mediante cambios en la composición de las biomembranas y acumulación en el citosol de moléculas osmoprotectoras y crioprotectoras que actúan manteniendo el turgor y protegiendo las macromoléculas y estructuras celulares. En chirimoya (*Annona cherimola* Mill.), el tratamiento con altas concentraciones de CO<sub>2</sub> por 3 días incrementa la tolerancia al daño por frío durante la conservación a bajas temperaturas. El análisis estructural por microscopía electrónica de barrido a baja temperatura reveló que los tejidos del mesocarpo de frutos tratados y conservados 9 días a 6 °C muestran una estructura consolidada y mantienen la integridad de las membranas. En estos tejidos, además de la presencia de diferentes quitinasas y glucanasas, se observa la expresión diferencial de dos isoenzimas de baja masa molecular, una endoquitinasa básica de 14 kDa y una 1,3-β-endoglucanasa glicosilada ácida de 19 kDa. El estudio funcional de estas proteínas reveló que, además de su actividad hidrolítica, presentan una alta actividad crioprotectora, siendo muy eficaces en la protección de proteínas criolábiles frente a la inactivación por congelación-descongelación, no mostrando ser activas como antifúngicas frente a *Botrytis cinerea*. A su vez, los tejidos pretratados con altas concentraciones de CO<sub>2</sub> incrementan los niveles de glicina-betaína, amina cuaternaria con función osmoprotectora y crioprotectora, durante el periodo de conservación a bajas temperaturas. Considerando el patrón de acumulación de glicina-betaína y el perfil de expresión de las proteínas crioactivas, los resultados obtenidos indican que estos pueden actuar como biomarcadores de tolerancia a bajas temperaturas al estar funcionalmente implicados en el mecanismo de defensa activa frente al daño por frío inducido por el tratamiento gaseoso.

---

1. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Departamento de Caracterización, Calidad y Seguridad, José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, 28040, Madrid, España.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas activan en respuesta al frío, uno de los principales estreses ambientales, una serie de genes y mecanismos bioquímicos y fisiológicos que les ayudan a minimizar los efectos negativos del estrés por bajas temperaturas. Algunas de estas reacciones implican cambios en el contenido de proteínas constitutivas o la síntesis de *novo* de péptidos y proteínas asociadas a la situación de estrés, entre ellas se hallan enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos, en la modificación de los lípidos de membrana o en la defensa antioxidante (Renaut et al., 2006), proteínas anticongelantes (AFP: Griffith y Yaish, 2004), proteínas crioprotectoras como dehidrininas (Rorat, 2006) o proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs: Van Loon et al., 2006).

En general, las PRs se inducen de manera coordinada frente a la infección de las plantas por patógenos y en respuesta al tratamiento con etileno, sin embargo, se ha observado la expresión de quitinasas y glucanasas en ausencia de ataque por patógenos u otro estrés inductor, estando implicadas en procesos de desarrollo y crecimiento (Goñi et al., 2010). Asimismo, diferentes estudios han demostrado el papel protector de distintas PRs, principalmente quitinasas, 1,3- $\beta$ -glucanasas y taumatina, en la aclimatación al frío presentando actividad anticongelante y/o crioprotectora (Hincha et al., 1997; Griffith y Yaish, 2004; Romero et al., 2008). Las AFPs presentan múltiples dominios hidrofílicos de unión al hielo inhibiendo su crecimiento así como la recristalización, por lo que disminuyen la formación de cristales extracelulares y evitan la formación de hielo intracelular y las proteínas crioprotectoras actúan protegiendo proteínas intracelulares y membranas del daño por bajas temperaturas y de la desnaturalización durante el proceso de congelación-descongelación. Estas proteínas además de actividad crioprotectora muestran actividad hidrolítica y antifúngica, confiriendo a las plantas aclimatadas más resistencia no solo al daño por congelación sino también al ataque por hongos.

Estudios previos han establecido el efecto beneficioso de pretratamientos con altas concentraciones de CO<sub>2</sub> en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) al retrasar los daños por frío causados en este fruto por la conservación a bajas temperatura (Merodio y De la Plaza, 1997; Maldonado et al., 2002). Aunque numerosos cambios bioquímicos han sido correlacionados con el aumento en la tolerancia al daño por frío aún no se ha establecido cual de ellos son adaptaciones a las bajas temperaturas y cuales desempeñan un papel funcional en la resistencia a la conservación a bajas temperaturas. Ya que la tolerancia al daño por frío viene determinada principalmente por la capacidad para evitar alteraciones en la estructura y conformación de las membranas celulares mediante cambios en la composición de las biomembranas y acumulación en el citosol de moléculas os-

moprotectoras y crioprotectoras que actúan manteniendo el turgor y protegiendo las macromoléculas y estructuras celulares, en este trabajo hemos estudiado el patrón de expresión de biomoléculas crioactivas y osmoprotectoras implicadas funcionalmente en el mecanismo de tolerancia a bajas temperaturas activado por el pretratamiento gaseoso con altos niveles de CO<sub>2</sub>.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Chirimoyas (*Annona cherimola* Mill. cv Fino de Jete), procedentes de Almuñecar (Granada), se mantuvieron en cámaras de respiración de 20 L en oscuridad a 6 °C bajo flujo de aire continuo o bajo tratamiento gaseoso (20% CO<sub>2</sub> + 20% O<sub>2</sub> + 60% N<sub>2</sub>). Después de 72 h de tratamiento gaseoso los frutos tratados fueron transferidos a condiciones de flujo de aire continuo. Periódicamente, los frutos fueron pelados, eliminadas las semillas, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su utilización.

Las proteínas fueron extraídas con tampón acetato sódico 0.1M pH 5.0, conteniendo 1.5 % PVPP, 10 mM EDTA y 20 mM ascorbato sódico, fraccionadas y concentradas mediante ultrafiltración y precipitación con sulfato de amonio (20-85%). La separación de las fracciones de proteínas ácidas y básicas se realizó utilizando una columna de intercambio aniónico Mono Q, unida a un sistema de FPLC (Pharmacia), a pH 8, siendo eluidas con NaCl 1 M. Las proteínas fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE e inmunodetectadas utilizando anticuerpos anti-PR-Q (quitinasa) y anti-PR-2 (1,3-β-glucanasa) de tabaco. Las proteínas fueron posteriormente purificadas por cromatografía iónica y cromatofoco.

La actividad anticongelante se evaluará determinando la actividad de histéresis termal en los extractos proteicos mediante calorimetría diferencial de barrido, utilizando BSA como proteína patrón sin actividad anticongelante y una AFP glicosilada de pez ártico (Romero et al., 2008).

La actividad crioprotectora de los extractos proteicos fue medida siguiendo el método descrito por Lin y Thomashow (1992), usando BSA como proteína crioprotectora patrón. El valor DP<sub>50</sub>, concentración de proteína crioprotectora necesaria para alcanzar un porcentaje de actividad lactato deshidrogenasa (LDH) residual del 50%, se determinó representando semilogarítmicamente el porcentaje de actividad LDH residual frente a la concentración de la proteína.

La actividad antifúngica de los extractos proteicos fue medida siguiendo el método descrito por Mauch et al. (1988), estimando la inhibición del crecimiento de las hifas de *Botrytis cinerea*. La concentración de proteínas utilizada en los ensayos de actividad antifúngica varió entre 60 y 300 µg, estando disueltas en tampón acetato sódico 20 mM, pH 5.5.

La glicina-betaína fue aislada y cuantificada siguiendo el método descrito por Storey y Wyn-Jones (1977). Los niveles de peroxidación lipídica fueron estimados mediante la cuantificación de malonildialdehído por el método del ácido tiobarbitúrico (Ederli et al., 1997).

Los datos de tres repeticiones han sido procesados por ANOVA (Statigraphic program, STSC, Rockville, MD.) para un nivel de significancia  $P \leq 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio del patrón de inducción de proteínas ácidas y básicas reveló que el incremento en la actividad crioprotectora parece estar asociado con la inducción por el tratamiento gaseoso de una isoenzimas quitinasa básica y una isoenzima 1,3- $\beta$ -glucanasa ácida de baja masa molecular, 14 (BChi14) y 19 (AGlu19) kDa, respectivamente (Fig. 2). La caracterización cinética y funcional de estas proteínas, tras su purificación por cromatografía iónica y cromatoenfoque, estableció su doble actividad, hidrolítica y crioprotectora, no presentando actividad antifúngica *in vitro* frente a *Botrytis cinerea*. Estas enzimas, una endoquitinasa básica de 14 kDa y una 1,3- $\beta$ -endoglucanasa glicosilada ácida de 19 kDa, presentan una alta actividad crioprotectora con un valor  $DP_{50}$  de 6.4  $\mu\text{g/mL}$  para la quitinasa y de 8.7  $\mu\text{g/mL}$  para la 1,3- $\beta$ -glucanasa, siendo 12.5 y 9.2 veces superiores al valor estimado para BSA (80.3  $\mu\text{g/mL}$ ). Los valores de actividad crioprotectora son del orden de aquellos descritos para otra familia de proteínas crioprotectoras muy activas, las dehidrininas (Bravo et al., 2003).

Asimismo, al evaluar los niveles de glicina-betaína en el mesocarpo de frutos tratados y no tratados hallamos que aunque los frutos recién recolectados son capaces de sintetizar esta amina cuaternaria, sus niveles descienden significativamente durante la conservación frigorífica, sin embargo el pretratamiento con un 20% de  $\text{CO}_2$  induce un progresivo incremento en los niveles endógenos de glicina-betaína alcanzando un máximo a los 9 días de conservación (Fig. 3).

Estas biomoléculas crioactivas y osmoprotectoras pueden actuar manteniendo el turgor y protegiendo las macromoléculas y estructuras celulares en los frutos pretratados con altas concentraciones de  $\text{CO}_2$ . El análisis estructural por microscopía electrónica de barrido a baja temperatura reveló que los tejidos del mesocarpo de frutos tratados y conservados 9 días a 6 °C muestran una estructura consolidada y mantienen la integridad de las membranas (datos no mostrados). A su vez, la evaluación de la funcionalidad de la membrana en frutos tratados y no tratados reveló mayor nivel de peroxidación lipídica (un aumento del contenido en malonildialdehído) en frutos no tratados lo que implica que el pretratamiento con altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  mantiene la integridad de la membrana evitando su rigidificación y daño por efecto de las bajas temperaturas de conservación.

Considerando el patrón de acumulación de glicina-betaína y el perfil de expresión de las proteínas crioprotectoras, los resultados obtenidos indican que estos pueden actuar como biomarcadores de tolerancia a bajas temperaturas al estar funcionalmente implicados en el mecanismo de defensa activa frente al daño por frío inducido por el tratamiento gaseoso.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está financiado por la CICYT, Proyectos AGL2008-02949 y AGL2011-26742.

## REFERENCIAS

- Bravo, L.A., Gallardo, J., Navarrete, A., Olave, N., Martínez, J., Alberdi, M., Close, T.J., and Corcuera, L.J. 2003. Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Physiol. Plant.* 118: 262-269.
- Ederli, L., Pascualini, S. Batani, P. and Antonielli, N. 1997. et al., 1997). Photoinhibition and oxidative stress: effects on xanthophyll cycle, scavenger enzymes and abscisic acid content in tobacco plants. *J. Plant Physiol.* 151: 422-428.
- Goñi, O., Sanchez-Ballesta, M.T., Merodio, C. and Escribano, M.I. 2010. Ripening-related defense proteins in *Annona* fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 55: 169-173.
- Griffith, M. and Yaish, M.W.F. 2004. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends Plant Sci.* 9: 399-405.
- Hincha, D.K., Meins, F. and Schmitt, J.M. 1997.  $\beta$ -1,3-Glucanase is cryoprotective in vitro and is accumulated in leaves during cold acclimation. *Plant Physiol.* 114: 1077-1083.
- Lin, C. and Thomashow, M.F. 1992. A cold-regulated *Arabidopsis* gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183: 1103-1108.
- Maldonado, R., Molina-Garcia, A.D., Sanchez-Ballesta, M.T., Escribano, M.I. and Merodio, C. 2002. High CO<sub>2</sub> atmosphere modulating the phenolic response associated with cell adhesion and hardening of *Annona cherimola* fruit stored at chilling temperature. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7564-7569.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. and Boller, T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissues. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanase. *Plant Physiol.* 88: 936-942.
- Merodio, C. and De la Plaza, J.L. 1997. Cherimoya. In: Mitra, S.K., editor. *Postharvest Physiology and Storage of Tropical and Subtropical Fruits*. Wallingford: CAB International p. 269-93.
- Renaut, J., Hausman, J.F. and Wisniewski E. 2006. Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism. *Physiol. Plant.* 126: 97-109.



- Romero, I., Fernandez-Caballero, C., Goñi, O., Escribano, M.I., Merodio, C. and Sanchez-Ballesta, M.T. 2008. Functionality of a class I beta-1,3-glucanase from skin of table grape berries. *Plant Sci.* 174: 641-648.
- Rorat, T. 2006. Plant dehydrins: Tissue location, structure and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 11: 536-556.
- Storey, R. and Wyn-Jones, R.G. 1977. Quaternary ammonium compounds in plants in relation to salt resistance. *Phytochemistry* 21: 777-791.
- Van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135-162.

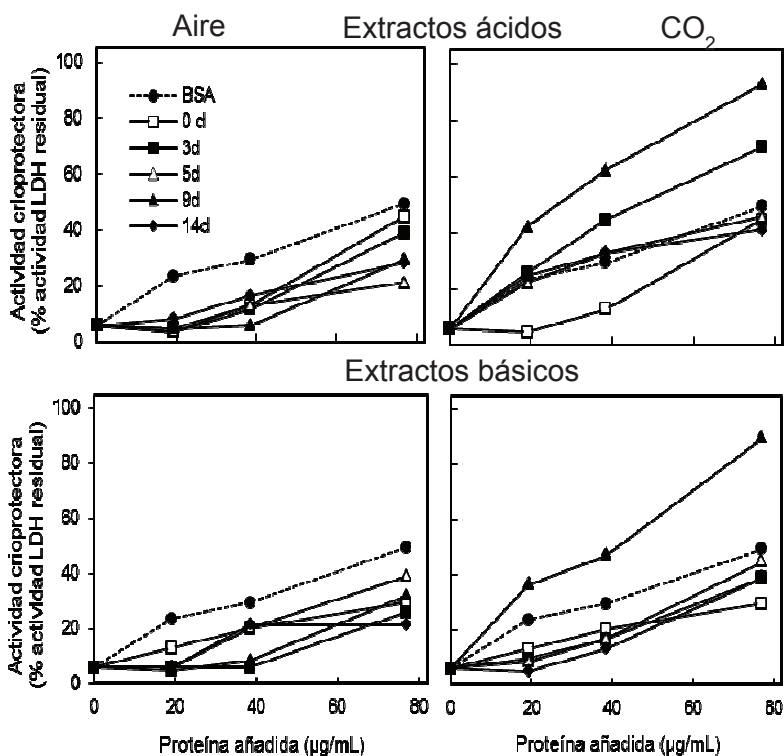


Fig. 1. Actividad crioprotectora en extractos proteicos ácidos y básicos procedentes de frutos tratados y no tratados con un 20% de CO<sub>2</sub> por 3 días durante la conservación a 6 °C.

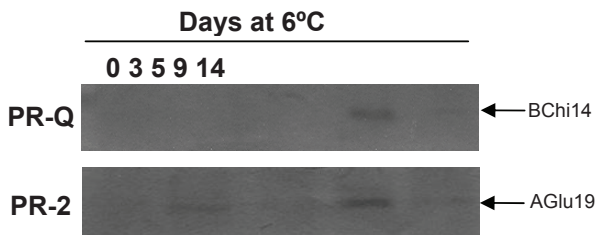


Fig. 2. Detección mediante inmunoensayo de isoenzimas quitinasa y 1,3-β-glucanasa inducidas diferencialmente en frutos pretratados con un 20% de CO<sub>2</sub> por 3 días.

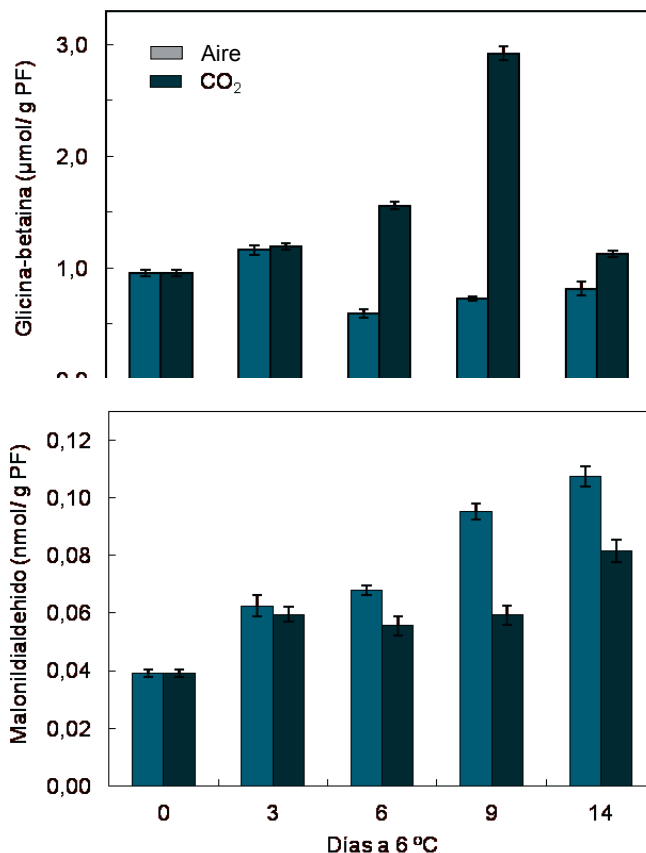


Fig. 3. Cambios en el contenido de glicina-betaina y malonildialdehído en el mesocarpio de chirimoya durante la conservación a 6 °C en aire y bajo el pretratamiento con un 20 % de CO<sub>2</sub> durante 3 días.