

Rev. FCA UNCuyo. Tomo 42. N° 2. Año 2010. 119-133.

Proteómica de la madurez del tomate: Identificación de dos estados de madurez del fruto por perfiles proteicos totales del pericarpio en RILs de tomate

Proteomics of the tomato ripening: Identification of two fruit ripening stages by total pericarp protein profiles in tomato RILs

Mariana Gallo ^{1,2}

Gustavo Rubén Rodríguez ²

Roxana Zorzoli ^{2,3}

Liliana Amelia Picardi ^{2,3}

Guillermo Raúl Pratta ^{2,4}

Originales: Recepción: 29/04/2009 - Aceptación: 02/09/2009

RESUMEN

Durante la madurez del fruto se producen cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos provocados por la expresión regulada de diferentes genes. El objetivo de este trabajo fue verificar si la presencia de polipéptidos totales del pericarpio en los estados verde maduro (VM) y rojo maduro (RM) permite caracterizar la madurez del tomate. Se analizaron 18 líneas endocriadas recombinantes obtenidas por selección antagonica-divergente de un cruzamiento entre la cv. Caimanta (*Solanum lycopersicum*) y la entrada LA722 (*S. pimpinellifolium*), que fueron incluidas junto a la F1 como testigos experimentales. Los extractos proteicos se obtuvieron de dos muestras independientes de cada estado según el protocolo estándar y se resolvieron en SDS-PAGE. Se analizó la presencia/ausencia de bandas por genotipos y por estado, detectándose 26 en VM y 29 en RM. Algunas bandas fueron comunes entre estados, mientras que otras resultaron propias de VM o RM, respectivamente. Se calcularon las distancias de Jaccard y se realizó un análisis de conglomerados según el método UPGMA. En el dendrograma (co-relación cofenética = 0,43) se distinguieron

SUMMARY

Several morphological, physiological, and biochemical changes are produced by the regulated expression of different genes during fruit ripening. The aim of this investigation was to check the ability of total polypeptides profiles of the pericarp tissue at the mature-green (VM) and red-ripe (RM) stages for characterizing tomato fruit ripening. Eighteen recombinant inbred lines obtained by antagonic-divergent selection from a cross between cv. Caimanta of *Solanum lycopersicum* and accession LA722 of *S. pimpinellifolium* (included with the F1 as experimental testers) were analyzed. Protein extracts were collected from two independent samples from each stage following the standard protocol and solved in SDS-PAGE. The presence/absence of polypeptides by genotypes and by stage was analyzed. Twenty-six polypeptides were detected in VM and 29 in RM. Some of them were common to both stages, while others were stage-specific (either in VM or in RM). Jaccard distances among stages were calculated and a conglomerates analysis was carried by UPGMA method. In the dendrogram (cophenetic correlation = 0.43) two well defined groups were distinguished

1 Tesinista de la Licenciatura en Biotecnología. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. C. C. 14. Zavalla. Argentina. S2125ZAA.

2 Cát. Genética. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. gpratta@unr.edu.ar

3 Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario.

4 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

dos grandes grupos definidos por el estado de madurez. Se concluye que los perfiles proteicos del pericarpio son una herramienta postgenómica apropiada para identificar dos estados de madurez del fruto de tomate.

by the ripening stage. As a conclusion, protein profiles of the pericarp are a postgenomic tool appropriate for identifying two ripening stages of the tomato fruit.

Palabras clave

biodiversidad • análisis multivariado • *Solanum* sección *Lycopersicon* • mejoramiento vegetal

Keywords

biodiversity • multivariate analysis • *Solanum* section *Lycopersicon* • plant breeding

INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo del fruto de tomate (*Solanum lycopersicum*) se produce una fase de división celular, una de expansión celular y una final de maduración. En esta última no hay incrementos significativos en el número ni el volumen de las células, permaneciendo el tamaño del fruto constante. En ella se producen múltiples cambios metabólicos que confieren el color, aroma, sabor, textura y consistencia característicos del fruto maduro (7). La acumulación de pigmentos carotenoides y el ablandamiento del fruto permiten distinguir diversos estados en la maduración: verde maduro (mature green), rompiente (breaker), pintón (turning), rosa (orange), rojo claro (red firm) y rojo maduro (red ripe).

Muchos caracteres que determinan la calidad del tomate para consumo están asociados a su madurez, tales como el contenido en sólidos solubles, la acidez, la firmeza y la vida poscosecha de los frutos. Varios genes mutantes que afectan el proceso natural de la madurez han sido descritos en tomate (21), entre ellos rin (ripening inhibitor), nor (non ripening), Nr (never ripe), alc (alcobaca). Estos genes que retrasan la madurez y confieren larga vida poscosecha a los frutos, producen efectos pleiotrópicos detrimentales sobre la calidad debido a que influyen también sobre vías metabólicas involucradas en brindar al fruto un adecuado sabor, aroma y textura. Por lo tanto, su uso en programas de mejoramiento genético es limitado (17).

Las especies silvestres emparentadas a un cultivo representan una fuente de diversidad genética para incorporar a los programas de mejoramiento genético. Como resultado de seis ciclos de selección antagónica-divergente conducida según el método genealógico para el peso y la vida poscosecha de los frutos en una generación F2 proveniente de un cruzamiento entre un cultivar estándar de *S. lycopersicum* (cv. Caimanta) y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium* (22), se generó un conjunto de líneas experimentales, recombinantes y divergentes en sus valores de peso, vida poscosecha y también otros caracteres asociados a la madurez de los frutos (18).

Como herramientas post-genómicas, los perfiles proteicos son metodologías moleculares apropiadas para caracterizar tanto genotipos como procesos biológicos

de interés (3, 10). En tomate, diferencias en los perfiles proteicos de frutos madurados en planta y frutos madurados en estantería fueron detectadas para ciertos genotipos pero no para otros (16). También fue posible caracterizar los estados de madurez verde maduro, pintón y rojo maduro por los polipéptidos presentes en el pericarpio de genotipos segregantes derivados de un cruzamiento entre un cultivar de *S. lycopersicum* homocigota para nor y una accesión de *S. lycopersicum* var. cerasiforme (20).

El objetivo general de este trabajo fue determinar los perfiles de proteínas totales del pericarpio en dos estados de madurez del fruto de tomate. Como objetivo específico se propone verificar la hipótesis de que los estados verde maduro y rojo maduro pueden ser inequívocamente identificados a través de tales perfiles en las líneas endocriadas recombinantes (RILs) generadas por el grupo de investigación en genética del tomate de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (19).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en el Campo Experimental J. F. Villarino y en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* y Biología Molecular de la Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, ubicado en la localidad de Zavalla, Provincia de Santa Fe (33° 1" S).

Material vegetal

Se utilizó como material genético 18 líneas recombinantes (RILs) que fueron obtenidas en el programa de selección divergente y antagónica para los caracteres peso y vida poscosecha de los frutos (19). Estas líneas se originaron siguiendo el método genealógico a partir del cruzamiento entre la cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* (origen Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria -INTA- Cerrillos, Salta) y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium* (origen: Tomato Genetic Resources Center, Universidad de California, Davis), materiales que junto a su F1 se incluyeron como testigos experimentales.

Los plantines se obtuvieron de la siembra en placas de Petri en cámara y luego se transvasaron a vasos de plástico en invernáculo hasta alcanzar un tamaño adecuado para su trasplante, a los 45 días de la siembra. Los plantines (diez por genotipo) se dispusieron en siete surcos siguiendo un diseño completamente aleatorizado. Se trabajó con un promedio final de nueve plantas por genotipo.

Perfiles proteicos

Obtención de muestra y extracción de proteínas totales del pericarpio

Para obtener los perfiles de proteínas totales se procesaron los frutos en dos estados de madurez: Verde Maduro (VM) y Rojo Maduro (RM). Por cada genotipo se obtuvieron tres muestras en cada estado de madurez. Se descartaron el exocarpio y endocarpio de los frutos y las semillas, utilizándose únicamente el pericarpio. Se pesaron 0,5 g del pericarpio y se guardaron a una temperatura de -20°C hasta el momento de la extracción de las proteínas.

La extracción de proteínas se realizó siguiendo el protocolo descrito por Rodríguez *et al.* (20), con modificaciones: el pericarpio se homogeneizó en N₂ líquido con mortero y se mezcló en presencia de 0,5 mL de buffer de extracción (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 M EDTA, 1 mM PMSF, 2% de β-mercaptoetanol) y 2 volúmenes de fenol saturado con Tris buffer 100 mM (pH 8,0). Luego fue centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase fenólica fue removida y mezclada con Tris 0,1 M hasta volumen final de 3 mL. Se centrifugó a 5000 rpm, por 10 minutos a 4°C. Nuevamente se rescató la fase fenólica, se llevó a un volumen final de 6 mL con Acetato de Amonio 0,1 M y se incubó a -20°C durante la noche.

Las proteínas fueron precipitadas por centrifugación a 5000 rpm durante 20 minutos a 0°C. El pellet se lavó dos veces con acetato de amonio en metanol (0,1 M) y una vez con acetona al 80% y se resuspendió en buffer de siembra (25 mM Tris pH 6,8, 1% SDS, 10% glicerol, 5% de β-mercaptoetanol y 0,002% bromofenol blue). Los extractos se guardaron a -20°C hasta su utilización.

Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas en solución se utilizó el método de Lowry (9), Solución A: CuSO₄.5H₂O 1%; Solución B: Tartrato de Na 2%; Solución C: Na₂CO₃ 2% en NaOH 0,1M y Solución M: 0,5 mL A; 0,5 mL B; 50 mL C, Solución F: Folin 1/3 en H₂O). Se tomaron 0,1 mL de muestra y se le agregó 1,1 mL de M, se mezcló e incubó por 10 minutos. Se le agregaron 0,1 mL de F y se incubó en oscuridad durante 15 minutos y se le midió transmitancia a 750 nm. Se utilizó BSA (albúmina de suero bovino) para obtener una curva de calibración, cuya linealidad se conservó en el rango de los 2,5 µg a 70 µg, y a partir de ésta se calculó la concentración de proteínas totales de las muestras.

SDS-PAGE

Las proteínas fueron separadas usando un gel de poliacrilamida a una concentración de 10% en condiciones desnaturalizantes, en el cual se sembró igual cantidad de proteína en cada una de las calles (10 µg). Se incluyó un marcador de peso molecular que contenía 4 proteínas de 97, 66, 45 y 30 kD. La electroforesis se realizó a intensidad de corriente constante (35 mA) y la tinción se realizó por Coomassie Brilliant Blue.

Análisis de los geles

Los geles fueron digitalizados y analizados con el programa GelPro, que permite determinar los pesos moleculares de los polipéptidos resueltos y seleccionados para su estudio a partir del marcador de peso molecular incluido en cada corrida.

Análisis estadísticos y genéticos

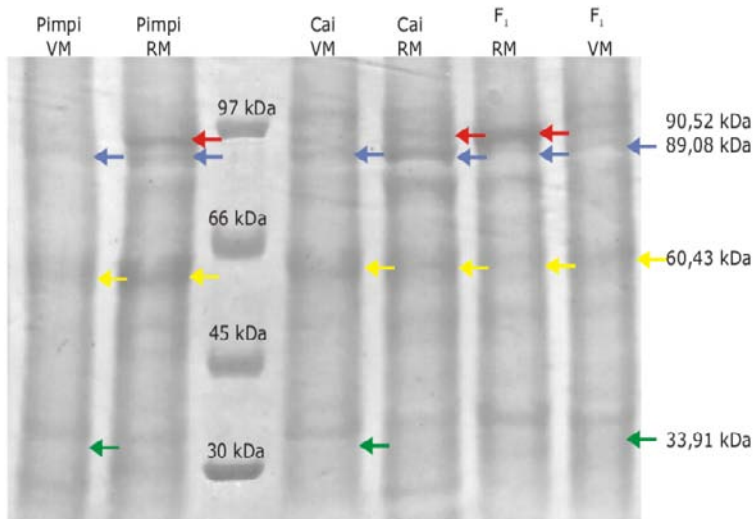
Para analizar si existe polimorfismo molecular entre genotipos y entre estados de madurez se procedió a la asignación de polipéptidos, que se realizó primeramente comparando los progenitores. Luego se incorporó la F1 para estimar el modo de herencia de los polipéptidos. De esta asignación se seleccionaron los polipéptidos de comportamiento robusto (es decir, los que se detectaron en la mayoría de las repeticiones), que fueron los considerados al analizar los perfiles en las RILs.

Se construyó una matriz con los polipéptidos en las columnas y los genotipos en las filas, en la que la presencia de cada polipéptido se identificó con un 1 y la ausencia con 0. A partir de esta matriz, se calcularon las distancias de Jaccard entre genotipos dentro de estado de madurez y para el conjunto total de datos y se obtuvieron dendrogramas según el método UPGMA para verificar el agrupamiento de los genotipos (2).

RESULTADOS

Análisis de los perfiles proteicos

Al analizar los geles correspondientes a los progenitores Caimanta y LA722 en el estado verde maduro, se detectaron 20 bandas con un 40% de polimorfismo, 12 de las cuales fueron monomórficas y 8 polimórficas (foto 1).



En azul, polipéptidos monomórficos en progenitores y polimórfico en RILs; en amarillo, polipéptido presente en ambos estados; en verde, polipéptido característico del estado verde maduro; en rojo, polipéptido característico del estado rojo maduro.

RM: estado de madurez rojo maduro, VM: estado de madurez verde maduro.

Pimpi: *S. pimpinellifolium*, Cai: *S. lycopersicum*

In blue, polypeptides that were monomorphic in parents and polymorphic in RILs; in yellow, polypeptide present in both ripening stages; in green, polypeptide unique to the mature green stage; in red, polypeptide unique to the red ripe stage.

RM: red ripe stage, VM: mature green stage.

Pimpi: *S. pimpinellifolium*, Cai: *S. lycopersicum*

Foto 1. Perfiles proteicos de progenitores y F1 en ambos estados de madurez.
Photo 1. Protein patterns of parents and F1 in both ripening stages.

Cuando se incluyó la F1 en el análisis se detectaron 23 bandas totales (es decir, hubo presencia de novo de ciertos polipéptidos), con un 61% de polimorfismo. Para los polipéptidos presentes en los progenitores se pudo determinar cuál alternativa (presencia o ausencia) fue la dominante y qué padre lo aportó. En las RILs se detectaron 3 bandas de novo adicionales, obteniéndose un total de 26 polipéptidos analizables, con un 92% de polimorfismo entre ellas (tabla 1 y foto 2, pág. 126).

Tabla 1. Asignación de bandas al estado verde maduro y su comportamiento.

Table 1. Mature green stage bands assignment and their behavior.

Polipéptido (kDa)	Verde maduro				
	Designación			Comportamiento	
	Cai	Pimpi	F1	Testigos	RILs
104,44	1	0	1	Domina la presencia (Cai)	Polimórfica
99,72	1	0	1	Domina la presencia (Cai)	Polimórfica
94,65	1	1	1	Monomórfica	Polimórfica
92,37	0	0	0	Ausente	<i>de novo</i> en RILs
90,52	0	0	0	Ausente	<i>de novo</i> en RILs
89,08	1	1	1	Monomórfica	Polimórfica
86,72	0	1	1	Domina la presencia (Pimpi)	Polimórfica
83,03	1	0	0	Domina la ausencia (Pimpi)	Polimórfica
81,27	0	1	1	Domina la presencia (Pimpi)	Polimórfica
78,41	1	1	1	Monomórfica	Polimórfica
75,95	1	1	0	<i>de novo</i> (ausente sólo en F1)	Polimórfica
69,57	0	0	1	<i>de novo</i> (presente sólo en F1)	Polimórfica
60,43	1	1	1	Monomórfica	Monomórfica
57,56	1	0	1	Domina la presencia (Cai)	Polimórfica
55,31	0	0	1	<i>de novo</i> (presente sólo en F1)	Polimórfica
48,84	1	1	1	Monomórfica	Polimórfica
46,32	0	0	0	Ausente	<i>de novo</i> en RILs
42,50	0	1	0	Domina la ausencia (Cai)	Polimórfica
40,28	0	1	1	Domina la presencia (Pimpi)	Polimórfica
38,21	1	1	1	Monomórfica	Polimórfica
35,13	1	1	1	Monomórfica	Polimórfica
33,91	1	1	1	Monomórfica	Monomórfica
31,08	1	1	1	Monomórfica	Polimórfica
29,88	1	1	0	<i>de novo</i> (ausente sólo en F1)	Polimórfica
27,97	1	1	0	<i>de novo</i> (ausente sólo en F1)	Polimórfica
25,73	0	0	1	<i>de novo</i> (presente sólo en F1)	Polimórfica

Cai: Progenitor Caimanta de *Solanum lycopersicum*; Pimpi: entrada LA722 de *S. pimpinellifolium*; F1: cruzamiento entre la cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* y la entrada LA722 de *S. pimpinellifolium*; RILs: líneas recombinantes que fueron obtenidas en el programa de selección divergente y antagónica para los caracteres peso y vida poscosecha de los frutos a partir del cruzamiento entre Cai y Pimpi.

Cai: Parent Caimanta of *Solanum lycopersicum*; Pimpi: accession LA722 of *S. pimpinellifolium*; F1: cross between cv. Caimanta of *S. lycopersicum* and accession LA722 of *S. pimpinellifolium*; RILs: recombinant lines obtained by antagonic-divergent selection for the traits fruit weight and post-harvest life from the cross between Cai and Pimpi.

En la tabla 2 se muestran los resultados del análisis en el estado rojo maduro. En los progenitores se encontró un total de 24 bandas, con un 50% de polimorfismo (foto 1, pág. 123).

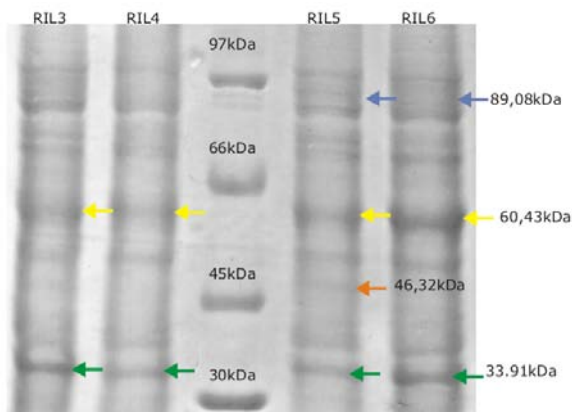
Tabla 2. Asignación de bandas al estado rojo maduro y su comportamiento.
Table 2. Red ripe stage bands assignment and their behavior.

Polipéptido (kDa)	Rojo Maduro				
	Desiganción			Comportamiento	
	Cai	Pimpi	F1	Testigos	RILs
104,44	1	0	0	Domina la ausencia (Pimpi)	Polimórficos
99,72	0	1	1	Domina la presencia (Pimpi)	Polimórficos
97,12	1	1	1	Monomórfico	Polimórficos
94,65	0	0	1	<i>de novo</i> (presente sólo en F1)	Polimórficos
90,52	1	1	1	Monomórfico	Monomórficos
86,72	1	1	0	<i>de novo</i> (ausente sólo en F1)	Monomórficos
77,20	1	1	1	Monomórfico	Polimórficos
73,41	1	0	1	Domina la presencia (Cai)	Polimórficos
68,48	0	1	0	Domina la ausencia (Cai)	Polimórficos
65,93	0	1	0	Domina la ausencia (Cai)	Polimórficos
62,17	1	0	1	Domina la presencia (Cai)	Polimórficos
60,43	1	1	1	Monomórfico	Polimórficos
59,07	1	0	0	Domina la ausencia (Cai)	Polimórficos
56,82	0	1	1	Domina la presencia (Pimpi)	Polimórficos
54,24	1	0	1	Domina la presencia (Cai)	Polimórficos
52,88	0	1	0	Domina la ausencia (Cai)	Polimórficos
51,31	1	1	0	<i>de novo</i> (ausente sólo en F1)	Polimórficos
48,84	0	0	0	Ausente	<i>de novo</i> en RILs
47,71	1	1	0	<i>de novo</i> (ausente sólo en F1)	Polimórficos
43,91	0	0	1	<i>de novo</i> (presente sólo en F1)	Polimórficos
41,89	1	1	1	Monomórfico	Polimórficos
40,28	1	0	1	Domina la presencia (Cai)	Polimórficos
38,21	0	1	0	Domina la ausencia (Cai)	Polimórficos
35,13	1	1	1	Monomórfico	Monomórfico
32,20	1	1	0	<i>de novo</i> (ausente sólo en F1)	Polimórficos
29,88	1	1	1	Monomórfico	Monomórfico
28,70	0	0	0	Ausente	<i>de novo</i> en RILs
26,39	1	1	0	<i>de novo</i> (ausente sólo en F1)	Polimórficos

Cai: Progenitor Caimanta de *Solanum lycopersicum*; Pimpi: entrada LA722 de *S. pimpinellifolium*; F1: cruzamiento entre la cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* y la entrada LA722 de *S. pimpinellifolium*; RILs: líneas recombinantes que fueron obtenidas en el programa de selección divergente y antagónica para los caracteres peso y vida poscosecha de los frutos a partir del cruzamiento entre Cai y Pimpi.

Cai: Parent Caimanta of *Solanum lycopersicum*; Pimpi: accession LA722 of *S. pimpinellifolium*; F1: cross between cv. Caimanta of *S. lycopersicum* and accession LA722 of *S. pimpinellifolium*; RILs: recombinant lines obtained by antagonic-divergent selection for the traits fruit weight and post-harvest life from the cross between Cai and Pimpi.

Cuando se tuvo en cuenta la F1, el total de bandas fue 26 con 73% de polimorfismo, siendo dominante en algunos casos Caimanta y en otros LA722. En el análisis de las RILs se detectaron 28 bandas totales, con un 86% de polimorfismo. También en este estado se detectaron bandas *de novo* (foto 3).

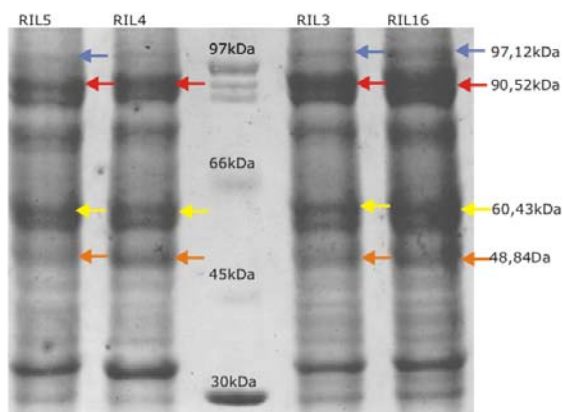


En azul, polipéptidos monomórficos en progenitores y polimórfico en RILs; en amarillo, polipéptido presente en ambos estados; en anaranjado, comportamiento *de novo* en RILs; en verde, polipéptido característico del estado verde maduro.

In blue, polypeptides that were monomorphic in parents and polymorphic in RILs; in yellow, polypeptide present in both ripening stages; in orange, polypeptide showing a *de novo* pattern in RILs; in green, polypeptide unique to the mature green stage.

Foto 2. Perfil proteico del estado verde maduro de algunas RILs.

Photo 2. Protein patterns of some RILs in the mature green stage.



En azul, polipéptidos monomórficos en progenitores y polimórfico en RILs; en amarillo, polipéptido presente en ambos estados; en anaranjado, comportamiento *de novo* en RILs; en rojo, polipéptido característico del estado rojo maduro.

In blue, polypeptides that were monomorphic in parents and polymorphic in RILs; in yellow, polypeptide present in both ripening stages; in orange, polypeptide showing a *de novo* pattern in RILs; in red, polypeptide unique to the red ripe stage.

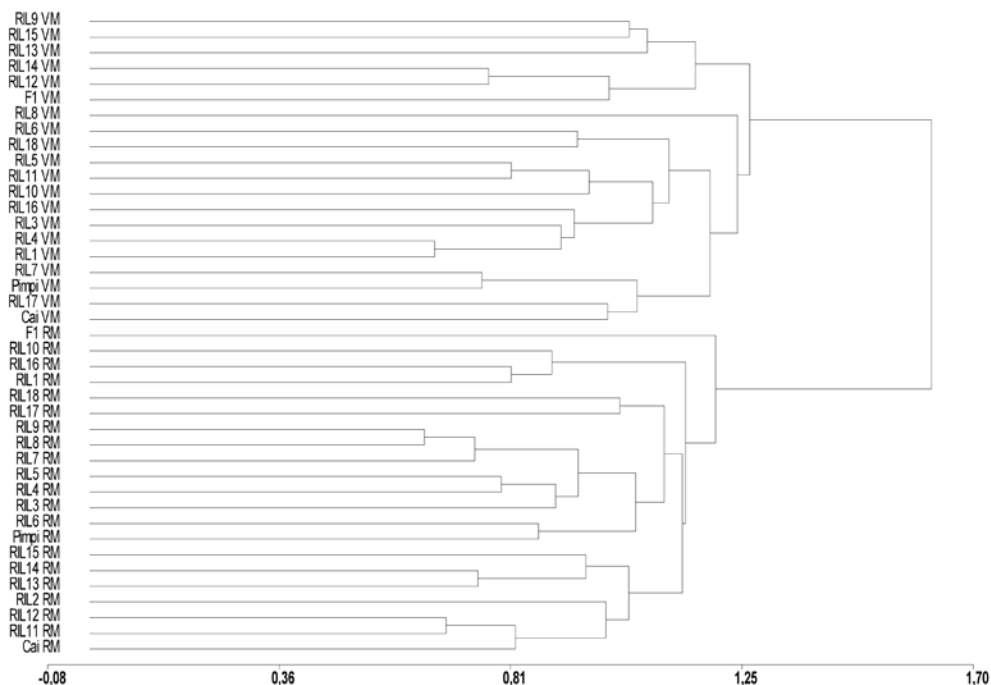
Foto 3. Perfil proteico del estado rojo maduro de algunas RILs.

Photo 3. Protein patterns of some RILs in the red ripe stage.

Análisis de agrupamiento con las bandas polimórficas

En este análisis no se incluye la RIL2 en el estado verde maduro debido a la falta de muestras representativas.

La figura 1 muestra el análisis de agrupamiento realizado para ambos estados de madurez agrupados con las bandas polimórficas de ambos progenitores, que mostró una correlación cofenética de 0,43. Las distancias de Jaccard entre todos los genotipos según estado de madurez variaron entre 0,64 y 2,31. Se observó que todos los genotipos en VM se ubicaron en la parte superior del dendrograma mientras que los genotipos en RM se ubicaron en la parte inferior.

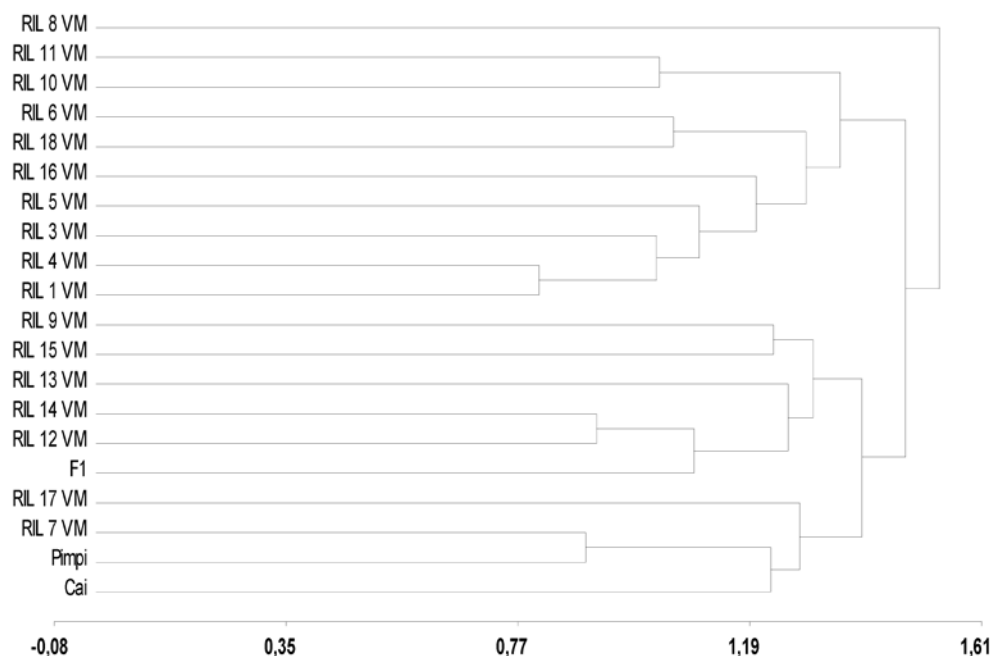


Cai: Progenitor Caimanta de *Solanum lycopersicum*; Pimpi: entrada LA722 de *S. pimpinellifolium*; F1: cruzamiento entre la cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* y la entrada LA722 de *S. pimpinellifolium*; RIL: línea recombinante obtenida en el programa de selección divergente y antagónica para los caracteres peso y vida poscosecha de los frutos a partir del cruzamiento entre Cai y Pimpi; VM: estado de madurez verde maduro; RM: estado de madurez rojo maduro. El eje de X corresponde a las distancias de Jaccard.

Cai: Caimanta parent of *Solanum lycopersicum*; Pimpi: LA722 parent of *S. pimpinellifolium*; F1: cross between Caimanta of *S. lycopersicum* and LA722 of *S. pimpinellifolium*; RIL: recombinant inbred line obtained from a divergent-antagonistic selection program for the traits fruit weight and shelf life from the cross Cai x Pimpi; VM: mature green stage; RM: red ripe stage. The X axis shows the Jaccard's distance.

Figura 1. Análisis de conglomerados con polipéptidos en ambos estados de madurez.
Figure 1. Conglomerate analysis of genotypes by polypeptide presence/absence at both ripening stages.

En las figuras 2 y 3 se muestran los análisis de agrupamiento realizados para cada uno de los estados de madurez con las bandas polimórficas de ambos progenitores: la F1 y las RILs. En la figura 2, para el estado verde maduro, se encontró una correlación cofenética de 0,54. Las distancias de Jaccard entre todos los genotipos variaron entre 0,81 y 1,54. En la figura 3 (pág. 129), para el estado rojo maduro, se encontró una correlación cofenética de 0,72. Las distancias de Jaccard entre todos los genotipos variaron entre 0,77 y 1,60. Se observa que la asociación de los genotipos no es la misma para cada estado de madurez.

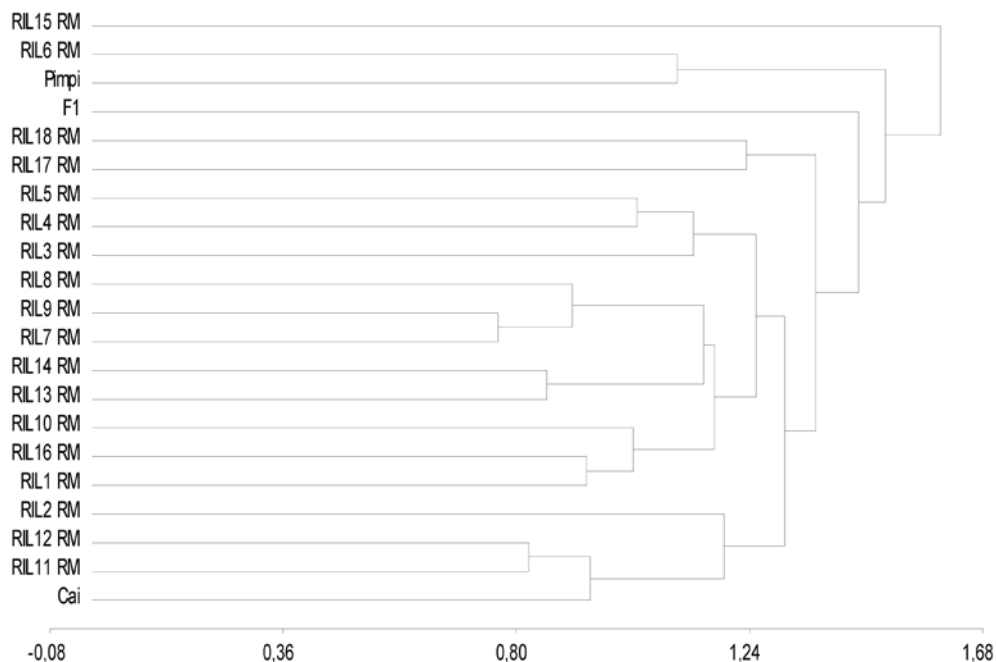


Cai: Progenitor Caimanta de *Solanum lycopersicum*; Pimpi: entrada LA722 de *S. pimpinellifolium*; F1: cruzamiento entre la cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* y la entrada LA722 de *S. pimpinellifolium*; RIL: línea recombinante obtenida en el programa de selección divergente y antagónica para los caracteres peso y vida poscosecha de los frutos a partir del cruzamiento entre Cai y Pimpi; VM: estado de madurez verde maduro. El eje X corresponde a las distancias de Jaccard.

Cai: Caimanta parent of *Solanum lycopersicum*; Pimpi: LA722 parent of *S. pimpinellifolium*; F1: cross between Caimanta of *S. lycopersicum* and LA722 of *S. pimpinellifolium*; RIL: recombinant inbred line obtained from a divergent-antagonistic selection program for the traits fruit weight and shelf life from the cross Cai x Pimpi; VM: mature green stage. The X axis shows the Jaccard's distance.

Figura 2. Análisis de conglomerados con polipéptidos del estado verde maduro.

Figure 2. Conglomerate analysis of genotypes by polypeptide presence/absence in the mature green stage.



Cai: Progenitor Caimanta de *Solanum lycopersicum*; Pimpi: entrada LA722 de *S. pimpinellifolium*; F1: cruzamiento entre la cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* y la entrada LA722 de *S. pimpinellifolium*; RIL: línea recombinante obtenida en el programa de selección divergente y antagónica para los caracteres peso y vida poscosecha de los frutos a partir del cruzamiento entre Cai y Pimpi; RM: estado de madurez rojo maduro. El eje de las X corresponde a las distancias de Jaccard.

Cai: Caimanta parent of *Solanum lycopersicum*; Pimpi: LA722 parent of *S. pimpinellifolium*; F1: cross between Caimanta of *S. lycopersicum* and LA722 of *S. pimpinellifolium*; RIL: recombinant inbred line obtained from a divergent-antagonistic selection program for the traits fruit weight and shelf life from the cross Cai x Pimpi; RM: red ripe stage. The X axis shows the Jaccard's distance.

Figura 3. Análisis de conglomerados con polipéptidos del estado rojo maduro.
Figure 3. Conglomerate analysis of genotypes by polypeptide presence/absence in red ripe stages.

DISCUSIÓN

Los resultados encontrados en este trabajo indican la existencia de una amplia variación genética para la presencia de polipéptidos en los dos estados fisiológicos analizados de la madurez del fruto. El número de bandas de polipéptidos detectadas por estado de madurez es coincidente con informes previos (12, 13, 20). El mayor grado de polimorfismo (92% en VM y 86% en RM) entre RILs respecto de sus progenitores (61% y 73%, respectivamente, considerando los tres testigos experimentales) sugiere

que la presencia de polipéptidos *de novo* es importante durante la madurez del fruto en estos materiales. Comportamientos *de novo* fueron ampliamente reportados tanto para marcadores de ADN como de proteínas específicas y totales por numerosos autores (8, 11, 14). Por ejemplo, se ha reportado expresión diferencial de polipéptidos tanto en genotipos silvestres, como mutantes, cultivados y sus híbridos (5, 13).

Por otro lado, algunos polipéptidos detectados en los parentales no fueron observados en el híbrido. Así, la F1 del cruzamiento entre *S. lycopersicum* y *S. pennellii* no expresó los perfiles de HSPs (heat shock proteins) de ambos padres (6). La F1 mostró todas las HSPs exclusivas del parental *S. pennellii*, y varias pero no todas las exclusivas del parental *S. lycopersicum*. Este hecho puede deberse a interacciones resultantes del aporte genético de ambos parentales.

El agrupamiento a partir de las proteínas totales del pericarpio del fruto mostró una separación neta de los genotipos por estado, formándose dos grandes grupos: uno con todas las líneas en VM y otro con todas las líneas en RM. Esto indica que el estado de madurez fue más importante que el genotipo para determinar las diferencias en la detección de polipéptidos y puede explicarse por la existencia tanto de bandas comunes a ambos estados como de bandas exclusivas de cada estado, siendo estas últimas las que permiten identificar inequívocamente cada estado de madurez del fruto.

Las bandas comunes detectadas fueron 11 de un total de 44 detecciones, del resto de polipéptidos 18 corresponden únicamente al estado RM y 15 son exclusivas del VM. Los polipéptidos comunes fueron los de 104,44; 99,72; 94,65; 90,52; 86,72; 60,43; 48,84; 40,28; 38,21; 35,13 y 29,88 kD. Estos resultados coinciden con lo informado por Rodríguez *et al.* (20) aunque no con lo señalado por Pereira da Costa *et al.* (12), siendo la causa posible de estas discrepancias los materiales genéticos analizados. Tanto en este trabajo como en el de Rodríguez *et al.* (20) se evaluaron generaciones segregantes de cruzamientos biparentales, lo que significa que como máximo sólo se analizan dos alelos por locus.

Cabe destacar, no obstante, que tanto los progenitores como el grado de desequilibrio genético fue distinto, ya que en Rodríguez *et al.* (20) se analizó la F2 de un cruzamiento entre una mutante de *S. lycopersicum* y una accesión de *S. lycopersicum* var. cerasiforme mientras que en este trabajo el material experimental fue una población de RILs derivada de una cultivar estándar para la madurez de *S. lycopersicum* y una accesión de *S. pimpinellifolium*. En ambos trabajos, sin embargo, fue posible considerar los perfiles proteicos de los progenitores como testigos del experimento, descartando para el análisis las bandas que no mostraron robustez. En Pereira da Costa *et al.* (12), en tanto, se caracterizó un conjunto de germoplasma silvestre de *Solanum* sección *Lycopersicon*, no pudiendo comparar los resultados del material experimental con testigos conocidos.

En otros experimentos se encontró expresión diferencial de genes codificantes de enzimas de la vía biosintética de los carotenoides, del metabolismo primario, de

la fotosíntesis y del metabolismo de la pared celular entre diferentes estados de madurez (4). A través de transcriptómica y análisis de metabolitos selectos, se ha confirmado que el desarrollo del fruto involucra varios loci que codifican tanto maquinaria de translocación como factores de transcripción y componentes del sistema de transducción de la señal, lo que implicaría una expresión diferencial de proteínas a lo largo de la madurez (1). De hecho, los genes asociados al metabolismo primario, a la fotosíntesis, al metabolismo de la pared celular y la respuesta hormonal fueron diferencialmente expresados.

En otro trabajo, la expresión de proteínas relacionadas al estrés y a la respuesta a senescencia aumentó durante el proceso de maduración en frutos del tomate, y la mayoría de las proteínas relacionadas a compuestos de carbono y el metabolismo de carbohidratos o el proceso oxidativo fue regulada positivamente durante el desarrollo del fruto, mostrando un aumento en su cantidad a lo largo de la madurez con una máxima abundancia en frutos maduros (5). En Rocco *et al.* (15) se encontró una serie de proteínas específicas que se expresaron diferencialmente en distintos ecotipos cultivados de tomate.

De la comparación de los clusters de proteínas en los dos estados de madurez se observó un patrón diferente de agrupamiento de las RILs, por lo cual, además de diferencias fisiológicas entre estados de madurez, puede verificarse que los perfiles proteicos marcan también las diferencias genotípicas que existen entre estos materiales recombinantes. Ciertas RILs agrupan con uno u otro de sus progenitores y las agrupaciones cambian con el estado de madurez, lo que indica que hubo recombinación de los genes que, aportados tanto por Caimanta como por LA722, codifican proteínas presentes en ambos estados de madurez.

CONCLUSIONES

Los perfiles proteicos del pericarpio del fruto de tomate en los estados verde maduro y rojo maduro permitieron identificar inequívocamente estos dos estados de la madurez de los frutos de tomate.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alba, R.; Payton, P.; Fei, Z.; McQuinn, R.; Debbie, P.; Martin, G. B.; Tanksley, S. D.; Giovannoni, J. J. 2005. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Journal*. 17: 2954-2965.
2. Balzarini, M.; Di Rienzo, J. 2004. Infogen. Software estadístico para análisis de datos genéticos. Editorial Universidad Nacional de Córdoba.
3. Canovas, F. M.; Dumas-Gaudot, E.; Recorbet, G.; Jorin, J.; Mock, H. P.; Rossignol, M. 2004. Plant proteome analysis. *Proteomics*. 4: 285-298.

4. Carbone, F.; Pizzichini, D.; Giuliano, G.; Rosati, C.; Perrotta, G. 2005. Comparative profiling of tomato fruits and leaves evidences a complex modulation of global transcript profiles. *Plant Science*. 94: 165-175.
5. Faurobert, M.; Mihr, C.; Bertin, N.; Pawlowski, T.; Negroni, L.; Sommerer, N.; Causse, M. 2007. Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. *Plant Physiology*. 143: 1327-1346.
6. Fender, S. E.; O'Connell, M. A. 1990. Expression of the heat shock response in a tomato interspecific hybrid is not intermediate between the two parental responses. *Plant Physiology*. 93: 1140-1146.
7. Giovannonni, J. J. 2005. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*. 16: S170–S180, Supplement 2004.
8. Liberatti, D. R.; Rodríguez, G. R.; Pratta, G. R.; Zorzoli, R.; Picardi, L. A. 2009. Assessment of total protein profiles for characterising new genetic combinations in fruit traits among RILs of *Solanum* spp. Enviado para su publicación a *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*.
9. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. 1952. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
10. Marchionni Basté, E.; Rodríguez, G. R.; Pratta, G. R.; Zorzoli, R. 2009. Genotype variations of early protein expression during tomato *in vitro* culture. *International Journal of Plant Development Biology*. 3: 10-14.
11. Marfil, C. F.; Masuelli, R. W.; Davison, J.; Comai, L. 2006. Genomic instability in *Solanum tuberosum* x *Solanum kurtzianum* interspecific hybrids. *Genome*. 49: 104-113.
12. Pereira da Costa, J. H.; Rodríguez, G. R.; Pratta, G. R.; Zorzoli, R.; Picardi, L. A. 2009. Characterisation of tomato germplasm by pericarp protein profiles and morphologic and biochemical fruit traits. *Fruits, Vegetables and Cereals Science and Biotechnology*. 3: 48-53.
13. Pratta, G. R.; Zorzoli, R.; Picardi, L. A.; Valle, E. M.; Carrillo, N. 2001. Characterization of tomato genotypes that differ in their fruit shelflife by analysis of total pericarp protein patterns at two ripening stages. *Acta Horticulturae*. 546: 483-487.
14. _____; Zorzoli, R.; Picardi, L. A.; Valle, E. M. 2007. Induction of ammonium metabolizing enzymesis is related with fruit shelf life in tomato crosses among cultivated, mutant and exotic germplasms. *International Journal of Plant Breeding*. 1: 70-73.
15. Rocco, M.; D'Ambrosio, C.; Arena, S.; Faurobert, M.; Scaloni, A.; Marra, M. 2006. Proteomic analysis of tomato fruits from two ecotypes during ripening. *Proteomics* 6: 3781-3791.
16. Rodríguez, G.; Sequin, L.; Pratta, G.; Zorzoli, R.; Picardi, L. A. 2004. Expresión diferencial de proteínas durante la madurez de los frutos en distintos genotipos de tomate. REDBIO 2004 - V Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agrícola. Boca Chica, República Dominicana.
17. _____; Pratta, G. R.; Zorzoli, R.; Picardi, L. A. 2005. Caracterización de la generación segregante de un híbrido de tomate con genes nor y silvestres. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 40: 41-46.
18. _____; Pratta, G. R.; Zorzoli, R.; Picardi, L. A. 2006. Evaluación de caracteres de planta y fruto en líneas recombinantes autofecundadas de tomate obtenidas por cruzamiento entre *Lycopersicon esculentum* y *L. pimpinellifolium*. *Ciencia e Investigación Agraria*. 33: 133-141.
19. _____; Pratta, G. R.; Zorzoli, R.; Picardi, L. A. 2006. Recombinant lines obtained from an interspecific cross between *Lycopersicon* species selected by fruit weight and fruit self life. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 131: 651-656.
20. _____; Sequin, L.; Pratta, G. R.; Zorzoli, R.; Picardi, L. A. 2008. Protein profiling in F1 and F2 generations of two tomato genotypes differing in ripening time. *Biologia Plantarum*. 52: 548-552.

21. Schuelter, A. R.; Finger, F. L.; Casali, V. W. D.; Brommonschenkel, S. H.; Otoni, W. C. 2002. Inheritance and genetic linkage analysis of a firm-ripening tomato mutant. *Plant Breeding*. 121: 338-342.
22. Zorzoli, R.; Pratta, G. R.; Picardi, L. A. 2000. Variabilidad genética para la vida postcosecha y el peso de los frutos en tomate para familias F3 de un híbrido interespecífico. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 35: 2423-2427.

Reconocimientos

A Sabina Mahuad, Ezequiel Marchionni Basté, Javier Pereira da Costa y David Liberatti.