

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE LAS ENZIMAS PG Y β -GAL EN TUNA (*Opuntia sp*) DURANTE LA MADURACIÓN

M.L Valderrama-Cháirez, A. Cruz-Hernández, P.E: Collazo-Siqués y O. Paredes-López. Departamento de Biotecnología y Bioquímica CINVESTAV IPN U. Irapuato. Km. 9.6 Libramiento Norte, Carretera Irapuato-León, 36500 Irapuato, Gto. A. P. 629, Tel (4) 6239600, Fax (4) 6245996, e-mail: oparedes@ira.cinvestav.mx

Palabras clave: Tuna, maduración y expresión genética

Introducción. El nopal tunero ocupa una superficie de 70,000 ha en el altiplano semiárido de México, de donde anualmente, se obtienen más de 330,000 ton de tuna. Las pérdidas anuales de la producción llegan hasta un 30% de la producción (1), la principal causa es el ablandamiento que acompaña a la maduración y a la senescencia (2). En el ablandamiento durante la maduración del fruto, se presentan cambios en el metabolismo y en la estructura de la pared celular como resultado de la actividad de algunas enzimas entre las que se encuentran la poligalacturonasa (PG) y la β -galactosidasa (β -gal) (3). El objetivo del trabajo fue obtener por RT-PCR secuencias genéticas de PG y β -gal y evaluar su expresión durante la maduración en tuna, que es un fruto no climatérico.

Metodología. Se emplearon tunas de la morfoespecie Blanca Cristalina en tres estadios de maduración. Para aislar las secuencias genéticas se diseñaron oligonucleótidos dirigidos a las regiones conservadas de estas enzimas y se amplificaron por RT-PCR. Después de clonar los fragmentos obtenidos se verificó su identidad mediante un análisis tipo Southern blot utilizando las sondas de PG de melón y β -gal de mango. Para obtener RNA de buena calidad con buen rendimiento, se modificó la metodología propuesta por Mason y Botella (4), se empleó 1 μ g de RNA total en cada reacción de RT y 10 μ g en los análisis tipo Northern blot usados para evaluar la expresión genética de las enzimas; la secuenciación se realizó mediante el método de terminación por dideoxinucleótidos.

Resultados. Por RT-PCR se obtuvieron varios fragmentos de DNA para la PG en un rango de 200 a 400 pb, según los oligonucleótidos empleados; se seleccionó un fragmento de 300 pb y se reamplificó, obteniéndose una sola banda de 282 pb. Para la β -gal se obtuvo un sólo fragmento del tamaño esperado (589 pb). Los fragmentos de DNA amplificados para PG y β -gal se clonaron en el vector pMOSBlue (Amersham Pharmacia). Para secuenciar se eligió un fragmento de PG y uno de β -gal, previamente identificados como positivos en el Southern blot con las sondas heterólogas. El análisis y comparación de las secuencias proteínicas mostró para PG una identidad de 81% con la PG de *O. organensis* y para β -gal del 86% con la de melón, confirmando así su identidad. En el análisis Northern blot se observó que la PG se expresa en estadio semimaduro, aunque disminuye ligeramente en el estadio maduro. De otra forma, la expresión de la enzima β -gal se presenta en los tres estadios de maduración incrementando su expresión conforme transcurre el proceso de maduración.

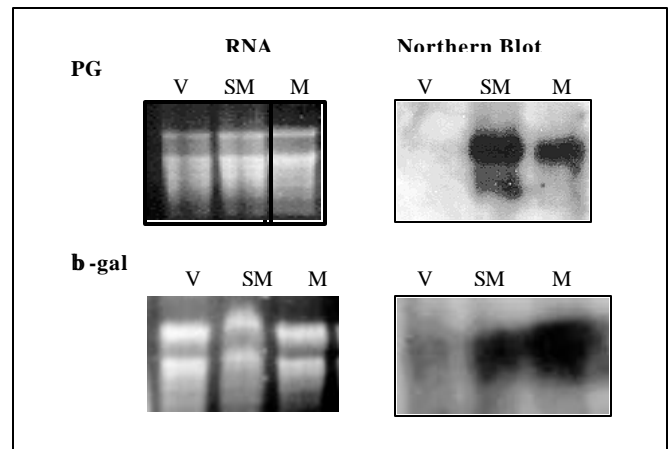


Fig. 1 Expresión de los transcritos de PG y β -gal en tuna Blanca Cristalina en tres estadios de madurez. V verde, SM semimaduro y M maduro.

Conclusiones. Se clonaron las secuencias genéticas de PG y β -gal. La expresión de los transcritos de PG y β -gal en la tuna de la morfoespecie Blanca Cristalina es diferencial durante la maduración. Se reporta por primera vez la expresión diferencial de la enzima PG en un fruto no climatérico. Asimismo, se evaluará la especificidad de la expresión de PG en diferentes partes del nopal (raíz, penca y flor), y el comportamiento de esta enzima cuando los frutos son sometidos a diversas atmósferas y agobios.

Agradecimientos Financiamiento parcial SIHGO CONACyT.

Bibliografía

1. Flores-Valdez, C.A., Ramírez-Moreno P.P., Luna-Esquivel, J.M., y Ponce-Javana, P. (1997). "Diagnóstico y programa de desarrollo del sistema producto tuna". SAGAR, UACH y CIESTAAM Eds. México.
2. Seymour G.A. (1996). Introduction. En: *Biochemistry of Fruit Ripening*. Ed. Seymour G.G., Taylor J.E. y Tucker G.A.. Chapman Hall eds. Impreso en Inglaterra, pp 1-51.
3. Fischer, R.L. y Bennett, A.B. (1991). "Role of cell wall hydrolases in fruit ripening". *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:675-703.
4. Mason M.G. y Botella J.R. (1997). Identification and characterization of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase cDNAs expressed during papaya (*Carica papaya*) fruit ripening. *Aust. J. Plant Physiol.* 24:239-244.