



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA “PRESIDENTE
JUÁREZ”**

**Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas
Área Temática de Fisiología y Genética Vegetal**

**“CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA Y PROTEÓMICA DEL PROCESO DE
MADURACIÓN DE FRUTOS DE ZARZAMORA (*RUBUS* sp.) CULTIVADA
EN LA REGIÓN DE MICHOACÁN, MÉXICO”**

T E S I S

QUE PRESENTA:

ING. BLANCA CRISTINA ALONSO OJEDA

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Directora de tesis

DRA. ANA TZTZQUI CHÁVEZ BÁRCENAS

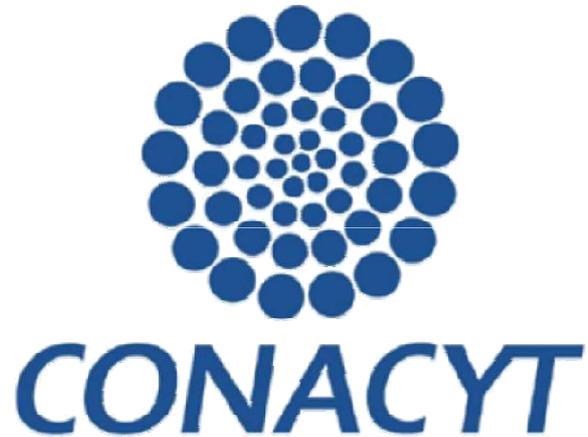
Co-Directora

DRA. SILVIA EDITH VALDÉS RODRÍGUEZ

Uruapan, Michoacán, Octubre 2017.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Interacciones Planta-Ambiente de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, y en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Proteínas de la Unidad Irapuato, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.





Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca 509972 otorgada para el desarrollo de la presente investigación dentro del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

AGRADECIMIENTOS

A mi casa de estudios la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**, por seguir acogéndome bajo su manto de sabiduría.

Al **CINVESTAV-IPN** unidad Irapuato por brindar las condiciones óptimas para realizar el presente proyecto.

A la **Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas** por brindarme su apoyo incondicional y no rendirse durante este arduo proyecto.

A la **Dra. Silvia E. Valdés Rodríguez** por ser una guía y brindarme soporte para la realización de este trabajo.

A mis sinodales, por siempre proponer mejoras a este proyecto y no abandonarlo.

A mis amigas **María, Magaly, Eunice** y **Ale** por ser la luz durante los días más oscuros.

A **Armando** por su tiempo y apoyo, todo para mejorar mi método.

DEDICATORIAS

A mi pequeña gran familia **Alonso Ojeda** por siempre empujar hacia adelante y ser la base fundamental en todo proyecto de mi vida.

A mis padres Gil y "Tita", por ser mi gran ejemplo de amor y mostrarme a través de su gran lente lo asombroso que es este instante de vida.

A Jorge mi esposo por ser y estar en todo momento de esta gran travesía, te quiero, te amo y te admiro.

Gil cuando leas esto sabrás que fuiste mi combustible, mi motor, mis frenos, mi aceite, mi claxon y la gran pasión que me llevo a lograr esta meta.

*"La fe, no hace que las cosas sean fáciles, hace que las cosas sean posibles" Lucas
1:37*

No fue fácil pero ¡lo logre!

CONTENIDO

	Pag.
ÍNDICE DE CUADROS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
1.1 Maduración de los frutos	3
1.2 Maduración de frutos climatéricos	5
1.3 Maduración de frutos no climatéricos	5
1.4 Propiedades fisicoquímicas de los frutos	7
1.5 Cambios metabólicos durante la maduración	8
1.6 Control de la maduración	9
1.7 Proteómica	9
1.7.1 La expresión diferencial durante el proceso de maduración de frutos.....	11
1.7.2 Obtención de proteínas totales.....	12
1.8 Descripción de la zarzamora	13
1.8.1 Variedades de zarzamora.....	16
1.8.2 Manejo del cultivo de la zarzamora en México.....	16
1.8.3 Cosecha.....	18
1.9 Características de los frutos	18
1.9.1 Postcosecha de los frutos.....	19
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. OBJETIVO	21
4.1 Objetivos Particulares	21

V.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
	5.1 Descripción del sitio de colecta	22
	5.2 Colecta de material biológico	23
	5.3 Análisis Físicoquímicos	23
	5.3.1 Peso y talla.....	23
	5.3.2 Firmeza.....	23
	5.3.3 Sólidos solubles totales.....	24
	5.3.4 pH.....	24
	5.3.5 Acidez Total Titulable.....	25
	5.4 Análisis de los resultados físicoquímicos	25
	5.5 Análisis proteómicos	25
	5.5.1 Protocolo de extracción con Fenol.....	25
	5.5.2 Protocolo de extracción con TCA/Acetona.....	26
	5.5.3 Limpieza de proteínas totales.....	26
	5.5.4 Cuantificación de proteína.....	27
	5.5.5 Electroforesis bidimensional (2-DE).....	27
	5.5.6 Isoelectroenfoco.....	27
	5.5.7 Equilibrio de los geles de IEF.....	28
	5.5.8 Separación en la segunda dimensión.....	28
	5.5.9 Tinción.....	29
	5.5.10 Análisis de imágenes.....	29
	5.5.11 Análisis estadístico multivariado.....	32
VI.	RESULTADOS	34
	6.1 Estadios del desarrollo de los frutos de zarzamora	34
	6.2 Propiedades físicoquímicas por estadio	36
	6.2.1 Firmeza.....	36
	6.2.2 Cambios en los SST.....	36
	6.2.3 pH.....	37
	6.2.4 Acidez Total Titulable.....	38
	6.3 Etapas de crecimiento y maduración durante el desarrollo de los frutos de zarzamora	38
	6.4 Análisis Proteómicos	39
	6.4.1 Extracción de proteínas totales.....	39
	6.4.2 Estandarización de metodología en geles de 18 cm.....	43
	6.4.3 Análisis de imagen.....	45
	6.4.3.1 Sobreposición de los geles.....	45
	6.4.4 Análisis de componentes principales.....	50

VII.	DISCUSIÓN	54
	7.1 Análisis Físicoquímicos.....	54
	7.2 Proteómicos.....	56
VIII.	CONCLUSIONES	59
IX.	BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cambios que ocurren durante la maduración.....	6
Cuadro 2. Clasificación Taxonómica de la zarzamora.....	15
Cuadro 3. Contenido nutracéutico de frutos de zarzamora.....	15
Cuadro 4. Condiciones de Isoelectroenfoco.....	28
Cuadro 6. Número de spots por gel de cada estadio de maduración.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frutos climatéricos y no climatéricos.....	4
Figura 2. Morfología de la planta de zarzamora.....	14
Figura. 3 Ubicación del sitio de colecta.....	22
Figura. 4 Análisis de textura de frutos de zarzamora.....	24
Figura. 5 Imagen del almacenamiento de imágenes y los parámetros de detección utilizados en el programa Melanie 7.0.....	31
Figura. 6 Escala de maduración de frutos de zarzamora.....	35
Figura. 7. Escala de peso de los frutos de zarzamora var. Tupi.....	35
Figura. 8. Cambios de firmeza durante los estadios de desarrollo de los frutos.....	36
Figura. 9 Cambios en la concentración de sólidos solubles totales (SST) de los frutos de zarzamora.....	37
Figura 10. Cambios en el pH del néctar de los frutos de zarzamora.	37
Figura 11. Cambios en el contenido de ácido cítrico en el néctar de frutos de zarzamora.....	38
Figura 12. Diferencia obtenida de los dos protocolos de extracción..	39
Figura 13. Electroforesis bidimensional en donde se comparan los protocolos de extracción.....	40
Figura 14. Evaluación del protocolo de limpieza de extractos de zarzamora (50 000 VT).....	41
Figura 15. Condiciones finales para enfoque de geles de 7 cm.....	42
Figura 16. Ensayos de isoelectroenfoco para geles de 18 cm.....	44

Figura 17. Condiciones de isoelectroenfoco para geles de 18 cm con frutos de zarzamora en etapas de maduración.....	44
Figura 18-A. Imágenes de las réplicas técnicas y detección de spots del estadio E4.....	47
Figura 18-B. Imágenes de las réplicas técnicas y detección de spots del estadio E6.....	48
Figura 18-C. Imágenes de las réplicas técnicas y detección de spots del estadio E7.....	49
Figura 19. Estructura de los datos basados en la comparación de los componentes 1 y 2.....	50
Figura 20. Traza de vectores de separación.....	51
Figura 21. Agrupación jerárquica de los <i>matches</i> que se observan durante la maduración de frutos de zarzamora.....	52
Figura 22. Agrupación jerárquica de los <i>matches</i> en base al ANOVA.....	53

RESUMEN

En este estudio se analizó la maduración de zarzamora "Tupi" utilizando dos acercamientos el análisis fisicoquímico de diferentes etapas del desarrollo de los frutos y el análisis proteómico de etapas de maduración contrastante. La zarzamora (*Rubus* sp.) es una planta que tiene una amplia capacidad de adaptación a diferentes climas; que se cultiva en diversas regiones del mundo. México se ha convertido en uno de los principales productores y exportadores de esta frutilla y el valor de la producción ha aumentado en más del 200 siendo el estado de Michoacán el principal productor. La zarzamora es una frutilla no climatérica, cuya su vida de anaquel se considera corta, lo cual limita la capacidad de exportación a los mercados con mayor demanda.

En el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización de la maduración de zarzamora variedad Tupi cultivada en la región de Ziracuaretiro, Mich., realizando una escala de ocho estadios de desarrollo y maduración de los frutos (E1 a E8). Los frutos de las ocho etapas se caracterizaron de acuerdo a su talla, peso, firmeza, contenido de sólidos solubles totales, porcentaje de ácido cítrico y pH del néctar, se logró determinar que el crecimiento y desarrollo del fruto de zarzamora var. Tupi está comprendido de E1 a E4 con una variación de peso de 1 a 6 g respectivamente, mientras que de E5 a E8 aumentó sólo 2 g. De acuerdo a los análisis fisicoquímicos de los frutos, se observó que las etapas de mayor contenido de ácido cítrico y pH son los primeros tres estadios, por el contrario los estadios E7 y E8 tienen el mayor contenido de azúcares. Por lo anterior, se consideró que los estadios E1 al E4 se consideraron como frutos inmaduros, mientras que del E5 al E7 como frutos maduros y el último estadio E8 representa la sobre maduración.

En cuanto al análisis proteómico la comparación de los estadios E4, E6 y E7 permitió detectar variaciones en diferentes manchas peptídicas observadas en los geles 2-DE. Cada estadio mostró un perfil electroforético característico que sugieren cambios de abundancia de proteínas que pueden ser claves en cada una de las etapas analizadas. La identificación de estas proteínas permitirá conocer los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de maduración de los frutos de zarzamora "Tupi".

Palabras Clave: Desarrollo, maduración, zarzamora, análisis fisicoquímicos, proteómica.

ABSTRACT

In this study, the maturation of "Tupi" blackberry was analyzed using two approaches, the physicochemical analysis of different stages of fruit development and the proteomic analysis contrasting maturation stages. The blackberry (*Rubus* sp.) is a plant that has a broad adaptability to different climates; which is grown in different regions of the world. Mexico has become one of the main producers and exporters of this small fruit and the value of the production has increased by more than 200% being the state of Michoacán the main producer. Blackberry is a non-climacteric small fruit which has a short shelf life. This limits the export capacity to the markets with greater demand.

In the present work the maturation of blackberry var. Tupi cultivated in the region of Ziracuaretiro, Mich., was characterized. This was carried out using a scale of eight stages of development and maturation of fruits (E1 to E8). The fruits of the eight stages were characterized according to their size, weight, firmness, total soluble solid content, percentage of citric acid and the nectar pH. It was possible to determine that the growth and development of the fruit of blackberry var. Tupy was between E1 and E4 with a weight variation of 1 to 6 g respectively, while from E5 to E8 increased only 2 g. According to the physicochemical analysis of the fruits, it was observed that the stages of higher content of citric acid and pH are the first three stages, in contrast to stages E7 and E8, which have the highest sugar content. Therefore, stages E1 to E4 were considered as immature fruits, whereas from E5 to E7 as mature fruits and the last E8 stage represents over ripening.

As for the proteomic analysis, the comparison of stages E4, E6 and E7 allowed to detect variations in different peptide spots observed in 2-DE gels. Each stage showed a characteristic electrophoretic profile suggesting changes in protein abundance that may be key in each of the stages analyzed. The identification of these proteins will allow to know the molecular mechanisms involved in the maturation process of the "Tupi" blackberry fruits.

I. INTRODUCCIÓN

Los mecanismos de modulación de la expresión génica, bioquímica y fisiológica de la maduración de frutos climatéricos ha generado un gran número de investigaciones, de las cuales se tienen como resultado diferentes estrategias para manejar y prolongar la vida de anaquel de dichos frutos (Kader, 1986; Reid y Staby, 2008), sin embargo, el proceso de maduración de frutos no climatéricos no ha sido tan extensamente estudiado, más aún, la maduración de frutos suaves como los de especies del género *Rubus* ha sido muy pobremente abordada, sobre todo en lo que se refiere a los frutos de zarzamora.

Los principales países productores de zarzamora en el mundo son Irán, Vietnam, y México. En nuestro continente México es el principal productor de esta frutilla obteniendo una producción de más de 152 000 ton en el 2014 lo que equivale a \$ 5, 111, 591.65 MN, es por esto que la zarzamora es uno de los 30 productos agrícolas de mayor importancia en el país, más del 96 % de la producción de zarzamora se da en el estado de Michoacán, lo que representa una fuente de trabajo para los pobladores michoacanos; sin embargo los mayores retos que tienen que enfrentar los productores y exportadores de fruto en fresco están asociados a la corta vida de anaquel que tiene la zarzamora, ya que en condiciones de atmosferas a 6 u 8 ° C, suele ser menor a ocho días posteriores a la cosecha (Piña-Dumoulin *et al.*, 2001).

La zarzamora es un fruto no climatérico debido a que en la etapa de maduración no se observa una correlación entre el aumento de CO₂ y la producción de etileno, por lo que este tipo de frutos debe ser cosechado en el punto de maduración de consumo, es por esto que su vida de anaquel es corta comparada con frutos más percederos como aguacate, manzana o ciruelas, debido a esta condición resulta relevante estudiar y comprender el metabolismo de la maduración ya que implica diferentes cambios en las características fisicoquímicas de cada fruto, así mismo la maduración es un evento irreversible y programado que involucra la expresión de genes que dan como resultado la coordinación de modificaciones fisiológicas, bioquímicas y organolépticas (Brady, 1987; Prasanna *et al.*, 2007). Debido a que el metabolismo de la maduración es tan complejo y representa cambios rápidos el estudio de las proteínas ha resultado ser una herramienta poderosa para el análisis de sucesos de esta magnitud, al utilizar las técnicas de Proteómica se analiza el proteoma que reflejan las proteínas que influyen directamente en una condición celular precisa de la etapa fenológica que se analiza.

Para poder conocer y eventualmente manipular las condiciones de manejo postcosecha con el fin de prolongar la vida de anaquel, es necesario comprender la maduración en frutos de zarzamora. Es por ello que en el presente trabajo se planteó evaluar las diferentes etapas fenológicas de los frutos de esta frutilla, las cuales

abarcaron desde el crecimiento y maduración de los frutos, analizando las propiedades fisicoquímicas de dichas etapas y estandarizar protocolos para el estudio de las proteínas asociadas al proceso de maduración de los frutos de la variedad comercial Tupi, que es altamente utilizada por los productores en la región de Michoacán, por su aceptación en el mercado y por tener ventajas en su manejo respecto a otras variedades anteriormente utilizadas; además, hasta donde los autores de la presente propuesta tienen conocimiento, no existen reportes del proceso de maduración en frutos de esta variedad.

El presente trabajo se caracterizó el proceso de maduración de frutos de zarzamora var Tupi utilizando análisis fisicoquímicos y analizando su proteoma. Con los resultados obtenidos se pretende proponer una estrategia para ampliar el campo del conocimiento respecto al proceso de maduración del fruto de zarzamora que es de creciente importancia económica en Michoacán y el país (Strik *et al.*, 2007).

II. REVISION DE LITERATURA

1.1 Maduración de los frutos

La maduración es la última fase de desarrollo de los frutos, en la que se encuentran involucrados diferentes cambios fisiológicos, bioquímicos y de expresión de genes, dentro de los cuales se encuentra la biosíntesis de pigmentos, conversión de almidón en azúcares simples, acumulación de ácidos orgánicos (Fray y Grierson, 1993; Schuch *et al.*, 1989). Este es un fenómeno esencial para la propagación de las especies (Causier y Davies, 2002; Katz *et al.*, 2007) y usualmente comienza en una zona y se extiende posteriormente al resto del fruto. La maduración es un proceso clave en la producción de fitonutrientes que son esenciales para el balance de la dieta y la prevención de enfermedades; ello debido a que altera varios aspectos críticos del fruto, incluyendo el contenido de fibra, la composición nutricional, el metabolismo de lípidos, los niveles de vitaminas y varios antioxidantes, durante la maduración se pierden algunas las características contrastantes de este proceso, como la textura repulsiva, la acidez y la astringencia, las cuales previenen la separación letal de las semillas inmaduras de la planta durante el periodo de crecimiento (Carrari y Fernie, 2006).

De acuerdo con la tasa de respiración que se mide con la cantidad de CO₂ que desprende un determinado peso de frutos en un tiempo fijo, los frutos han sido clasificados en dos categorías: climatéricos o no climatéricos (Figura 1). Los climatéricos se caracterizan por el incremento brusco de la tasa de respiración y la síntesis de etileno durante la maduración; por otra lado, los frutos no-climatéricos, en los cuales la respiración y la síntesis de etileno permanecen constantes, aunque algunos pueden responder a etileno, como es el caso de los cítricos; el etileno no es requerido para la maduración de estos frutos (Lelievre *et al.*, 1997).

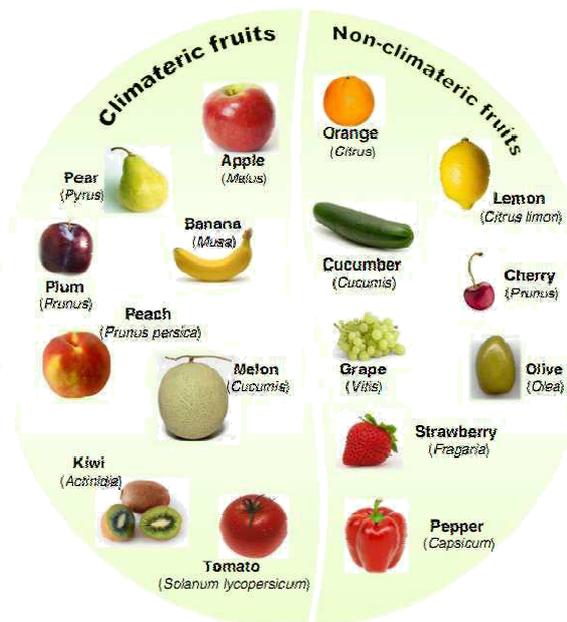


Figura 1. Frutos climatéricos y no climatéricos (Palma *et al.*, 2011)

La proteómica, a pesar de ser una ciencia reciente, ha logrado grandes avances en el conocimiento de las proteínas, analizando la tasa de síntesis, el nivel de expresión, la determinación de la localización y la función de una proteína, así como los efectos de modificaciones postraduccionales, la regulación, la caracterización, el análisis proteómico diferencial, los estudios en patogénesis microbial, la respuesta a tratamientos y agentes: todo ello realizando una valiosa aportación en la investigación de los seres vivos (Vihinen, 2001).

Específicamente, en el proceso de maduración de frutos se han identificado algunas de las enzimas que se han caracterizado en el ablandamiento de paredes celulares, como la endo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.15; PG) y la pectin-metil-esterasa (EC 3.1.1.11; PME); también se ha detectado actividad celulolítica en frutos maduros y sobremaduros de fresa, sugiriendo la participación de endo 1,4- β -D-glucanasa (EC 3.2.1.4) (Kumar y Ellis, 2001). Adicionalmente, en fresa y frambuesa los cambios en el estado de maduración de frutos se asocian con cambios en la coloración y sabor de los mismos; estos cambios coinciden con el aumento en la acumulación de antocianinas, dependientes de la expresión y actividad de fenilalanina amonioliasa (EC 4.3.1.5; PAL); (Kumar y Ellis, 2001; Manning, 1996). En zarzamora se conoce que la concentración de antocianinas es menor en frutos con 50 % de coloración negra que en frutos en otros estados de maduración; además, se ha reportado que frutos negro-opacos tienen una mayor concentración de antocianinas que los frutos negro-brillante, los cuales son de textura más firme (Perkins-Veazie *et al.*, 1996).

1.2 Maduración de frutos climatéricos

La maduración de los frutos climatéricos es estudiada por la importancia que éstos tienen a nivel comercial, particularmente porque en ellos el etileno actúa como un inductor de muchos genes asociados con los cambios en el color, en la reserva de carbohidratos y en el ablandamiento de la pulpa (Srivastava, 2002). Se ha demostrado, por medio de plantas transgénicas, que la producción continua de etileno conduce al proceso de la maduración en los frutos climatéricos, donde la producción de etileno es acortada drásticamente por la inserción de la secuencia codificante para los genes de la ACC sintasa y la ACC oxidasa, en una orientación antisentido, lo que ha mostrado que no existe climatérico ni maduración (Srivastava, 2002). Durante la maduración del tomate, más de 20 mRNAs son regulados, los genes sobre-expresados incluyen enzimas de la biosíntesis de etileno y del metabolismo de azúcares y de almidón, de la degradación de la pared y de la acción antioxidante; sin embargo, se desconoce el hecho de que la expresión de muchos genes es coordinada y precisa (Srivastava, 2002). Algunos genes están expresados en estados tempranos cuando la concentración de etileno es todavía baja, además, otros se expresan en el estado tardío de la maduración de los frutos, entre los RNAm expresados en el estado temprano están los que codifican para las enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa (Prasanna *et al.*, 2007).

1.3 Maduración de frutos no climatéricos

La maduración de frutos no climatéricos no se ha estudiado tan extensamente como en el caso de frutos climatéricos. La maduración de la fresa involucra muchos de los cambios que se han visto en la maduración de los frutos climatéricos, como es la pérdida de la clorofila y la adquisición de antocianinas, así como la acumulación de sacarosa, hexosas y volátiles del sabor como alcoholes aldehídos y ésteres, y el ablandamiento del fruto, la implicación del etileno en los frutos no climatéricos es poco comprendida; no obstante, existen algunas evidencias experimentales que sugieren que esta hormona puede tener un papel regulatorio en los eventos bioquímicos y fisiológicos que conducen a la maduración en frutos no climatéricos (Goldschmidt, 1998; Porata *et al.*, 1999).

Entre los cambios más notorios durante este proceso están los físicos, químicos y metabólicos (Cuadro 1), siendo de manera general la alteración en la biosíntesis y la acumulación de pigmentos, la síntesis y acción de las hormonas, la modificación de la textura vía alteración de la turgencia celular, la estructura y metabolismo de la pared celular; así como la modificación de azúcares, ácidos y volátiles que afectan la calidad nutricional, el sabor, el aroma y el incremento en la susceptibilidad a patógenos (Asif

y Nath, 2005; Giovannoni, 2004). Durante la maduración es común que ocurran modificaciones externas de la pared celular; éstas son las bases de procesos como ablandamiento, deterioro del tejido y susceptibilidad a patógenos; además estos cambios afectan todos los compartimentos celulares y requieren de la expresión de nuevos genes, sobre todo aquellos que codifican para enzimas que catalizan reacciones esenciales para el desarrollo de los atributos de calidad (Brady, 1987; Grierson y Schuch; 1993). Los cambios metabólicos durante la maduración incluyen un incremento en la biosíntesis y evolución de la hormona de la maduración (Yang y Hoffman, 1984), así como un incremento en la respiración mediada por enzimas mitocondriales, especialmente oxidasas y síntesis de *novo* de enzimas que catalizan cambios específicos de la maduración (Tucker y Grierson, 1982); y también a la regulación de metabolitos secundarios de importancia para la calidad del fruto (Rosas, 2008).

Cuadro 1. Cambios que ocurren durante la maduración. (Rosas, 2008).

CAMBIOS FÍSICOS Y QUÍMICOS	CAUSAS
Color	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de clorofila • Desmantelamiento del aparato fotosintético • Síntesis de antocianinas, betalainas y carotenoides
Textura	<ul style="list-style-type: none"> • Alteración en la composición de las paredes celulares • Solubilización parcial de las pectinas y celulosa <ul style="list-style-type: none"> • Degradación del almidón
Sabor y Aroma	<ul style="list-style-type: none"> • Acumulación de azúcares • Producción de compuestos volátiles • Cambios en la acidez
CAMBIOS METABÓLICOS	CAUSAS
Alteración del control de las vías metabólicas existentes	<ul style="list-style-type: none"> • Incremento en la tasa respiratoria • Síntesis de etileno
Cambios en la expresión genética	<ul style="list-style-type: none"> • Desaparición del RNAm y proteínas sintetizadas antes de la maduración • Aparición del RNAm y proteínas sintetizadas durante la maduración

1.4 Propiedades fisicoquímicas de los frutos

Las características fisicoquímicas de los alimentos son aquellas cualidades que presenta un alimento para ser consumido; para ello, diversos análisis son practicados en los alimentos para resaltar las cualidades fisicoquímicas. En especial, en los frutos son evaluadas características como la coloración, el peso, la acidez titulable, el contenido de sólidos solubles totales, así como el contenido de pH en el néctar y la textura; todas estas características tienen la particularidad de ser evaluadas por cada consumidor al momento de ser ingeridas, lo que nos lleva a decir que las características fisicoquímicas de los frutos son aquellas propiedades que hacen que un fruto sea agradable y de buena calidad para los consumidores (García, 2011).

Es común que los cambios en el color de los frutos ocurran conforme progresa la maduración de éstos; sin embargo, no en todos (los frutos) suceda así. La coloración de los frutos es el parámetro principal del consumo preferente de éstos; ello está determinado por los pigmentos que absorben la luz de ciertas longitudes de onda y reflejan o transmiten la luz de otras. Por lo general, las membranas tilacoidales y los pigmentos clorofílicos son fraccionados, lo que ocasiona una progresiva acumulación de pigmentos en los plástidos y el desensamble del aparato fotosintético (Srivatsva, 2002). En muchos frutos la pérdida de clorofila es acompañada por la biosíntesis de uno o más pigmentos, usualmente antocianinas o carotenoides, como el β -caroteno, xantofilas, xantofilas ésteres y licopeno (Rosas, 2008). El color del fruto es afectado, no solamente por la concentración de pigmentos, sino también por la estructura física del alimento; esto debido a la forma en que se dispersa la luz desde la superficie (Tucker y Grierson, 1982).

El peso de los frutos es un indicador de los contenidos de materia seca, sobre todo de agua; también es una característica deseable para los productores, ya que frutos más grandes generan mayores ingresos (Srivastava, 2002).

El incremento en el sabor y el aroma durante la maduración de los frutos es atribuida a la producción de una compleja mezcla de compuestos volátiles, como el ocimeno y el mirceno (Lizada, 1993) y la degradación de los principales compuestos que brindan el sabor amargo como los flavonoides, los taninos y los compuestos relacionados (Tucker y Grierson, 1982). El desarrollo del sabor se debe principalmente a un incremento de la gluconeogénesis, así como la hidrólisis de polisacáridos (especialmente almidón), disminución de la acidez y la acumulación de azúcares y ácidos orgánicos (volátiles), lo que resulta en una excelente mezcla azúcar-ácido (Lizada, 1993). La acidez total titulable en frutos es el contenido total de ácido en un alimento; en frutos, el ácido predominante suele ser al ácido cítrico (Lizada, 1993; Selvaraj *et al.*, 1989).

La maduración de los frutos involucra la conversión de precursores de alto peso molecular a componentes químicos pequeños que proveen una máxima nutrición a las semillas y atracción de los dispersores. El contenido de sólidos solubles es un estimador del contenido de azúcar en los jugos de frutas, ya que ésta representa más del 90% de la materia soluble en la mayoría de ellos; esta medición se da por medio de la refractometría y se basa en los cambios del índice de refracción que sufre una sustancia cuando otra es disuelta en ella. Si consideramos el jugo de fruta como una sustancia constituida por agua, su índice de refracción será mayor cuanto mayor sea la cantidad de azúcar presente en ella (Stroshine, 1999)

La acidez, medida ésta por el valor de pH, es un buen indicador del estado general del producto, ya que tiene influencia en múltiples procesos de alteración y estabilidad de los alimentos, así como en la proliferación de microorganismos; la textura fundamental para la aceptabilidad de los frutos y para su posible almacenamiento, depende del momento de recolección y de la temperatura de almacenamiento y puede relacionarse con el color externo (Stroshine, 1999; Valero Ubierna y Ruiz Altisent, 1996)

El ablandamiento y cambios de la textura de los frutos ocurren mientras la pared celular de éstos es modificada y parcialmente desensamblada por enzimas; los cambios en la presión de turgor y la degradación de polisacáridos de la pared celular y almidón determinan el ablandamiento de los frutos (Grierson *et al.*, 1981; Tucker y Grierson, 1982). El ablandamiento es un proceso programado durante la maduración en muchos frutos; gran parte de este proceso es la consecuencia de modificaciones en la estructura de la pared celular, lo que llega a mostrar diferencias en la textura de los frutos, incluyendo la jugosidad, la consistencia y el turgor (Seymour *et al.*, 2002).

1.5 Cambios metabólicos durante la maduración

Durante la maduración de frutos, los cambios metabólicos incluyen un incremento en la biosíntesis del etileno, en la respiración mediada por enzimas mitocondriales, especialmente oxidasas y síntesis *de novo* de enzimas que catalizan cambios específicos de la maduración (Tucker y Grierson, 1982). Los dos sustratos mayoritarios de la respiración encontrados en frutos son los azúcares y los ácidos orgánicos contenidos en la vacuola; ambos brindan una mayor contribución al sabor de los frutos (Kumar, 1989). De manera controlada, la vacuola libera estos sustratos dejándolos disponibles para la respiración. Las rutas utilizadas durante la respiración para la oxidación de los azúcares, comunes en todos los tejidos de las plantas, son la glicólisis, la ruta de la pentosa fosfato oxidasa y la ruta de los ácidos tricarbónicos; los azúcares más comunes son la fructosa, la glucosa y sacarosa; y los ácidos orgánicos mayoritarios son el malato y el citrato (Rosas, 2008). Los frutos continúan acumulando

el azúcar de la planta durante la maduración y en algunos casos, como en la fresa y la uva, éstos contribuyen en gran parte al sabor y al olor (Grierson y Tucker, 1983).

El mayor ácido orgánico usado para la respiración es el malato y su utilización como sustrato es mediada por la enzima málica (Kumar 1989). En los frutos se ha encontrado una enzima málica, la citosólica, dependiente ésta de NADPH, así como una enzima málica mitocondrial dependiente de NAD; ambas catalizan la descarboxilación reductiva de malato a piruvato, permitiendo que el carbono de malatose introduzca al ciclo del ácido tricarbóxico para la producción de piruvato por la glicólisis (Vendrell, 1985). Otros ácidos orgánicos, tales como el citrato y el succinato, pueden entrar directamente al ciclo del ácido tricarbóxico (Kumar, 1989).

1.6 Control de la maduración

Actualmente el control de la maduración es de suma importancia a nivel mundial, la comprensión de la regulación de este proceso es limitada, reduciendo así la capacidad de modificarla. De manera general, las auxinas, la giberelinas y las citocininas actúan retardando la maduración, mientras que el etileno y el ABA aceleran este proceso (Vendrell, 1985). La adición de etileno puede acelerar la respiración climatérica e inducir la maduración bajo ciertas condiciones (Grierson y Tucker, 1983).

Existe mucha demanda en cuanto a la manipulación de la maduración de frutos por consumidores y por las compañías comercializadoras de frutos en fresco, para lo cual se han establecido diferentes manejos poscosecha, sin embargo el hecho de comprender el mecanismo genético y molecular responsable de la maduración representa un reto para la investigación, la expresión de genes a los que se les atribuye la maduración se ha estudiado en tomate (Fei, *et al.*, 2004; Lemaire-Chamley *et al.* 2005) y en frutos no climatéricos se han reportado genes involucrados en maduración en fresa, uva y cítricos (Aharoni *et al.*, 2002; Katz *et al.*, 2004; Terrier *et al.* 2005).

1.7 Proteómica

La proteómica se define como “el análisis sistemático, directo, cualitativo y cuantitativo global de las proteínas presentes en un organismo, tejido, célula o

compartimiento subcelular bajo ciertas condiciones fisiológicas y ambientales” (Cánovas *et al.*, 2004).

La genómica se encarga del estudio de los genes y la proteómica la complementa enfocándose en los productos génicos, es decir, en el estudio de las proteínas, similar al perfil de la expresión génica (Vihinen, 2001). La proteómica ofrece la oportunidad de examinar y clasificar los patrones temporales de la acumulación de proteínas que ocurren en procesos complejos del desarrollo (Cánovas *et al.*, 2004). La principal diferencia entre el análisis del genoma y del proteoma es que el genoma es estático, mientras que el proteoma de cada célula es dinámico, y se altera en respuesta a los estados metabólicos de células individuales y percepción de moléculas de señalización intracelulares o extracelulares (Vihinen, 2001).

La herramienta más ampliamente usada para la proteómica comparativa, es la comparación de los perfiles electroforéticos de proteínas en geles bidimensionales (2-DE), ya que permite resolver una numerosa cantidad de proteínas (Rose y Saladié, 2008)

La electroforesis bidimensional (2-DE) fue introducida por O’Farrell en 1975; ésta es una técnica ampliamente utilizada para el análisis y la detección de proteínas extraídas de diversas muestras biológicas; esta técnica separa proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI), por medio de Isoelectroenfoco (IEF) en la primera dimensión, y de acuerdo a su masa peso molecular (MmW) por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) en la segunda dimensión (Cánovas *et al.*, 2004). Puesto que estos dos parámetros no están relacionados, es posible llegar a separarse miles de manchas (proteínas) diferentes y obtener una distribución casi uniforme; cada mancha en un gel de dos dimensiones corresponde a una proteína de la muestra (Berkelman y Stenstedt, 1998; O’Farrell, 1975).

Gracias al constante mejoramiento en ésta tecnología, junto con el progreso en la identificación de proteínas, el desarrollo de programas que permiten analizar los patrones de expresión y las extensas bases de datos que han sido desarrolladas, se puede hacer un análisis comparativo del perfil de abundancia de proteínas; las proteínas relacionadas a la maduración de los frutos pueden ser identificadas y caracterizadas usando proteómica comparativa (Rose y Saladié, 2008).

El análisis de patrones de proteínas en electroforesis 2-DE y la identificación de proteínas se han transformado en una poderosa herramienta para el análisis funcional en plantas (Cánovas *et al.*, 2004). Actualmente se cuenta con la genómica y la proteómica, las cuales son herramientas claves y complementarias para el estudio de todos los organismos (Rose y Saladié, 2008; Cánovas *et al.*, 2004).

El análisis de proteínas es el enfoque más directo para el estudio del metabolismo dinámico de las plantas. La proteómica puede utilizarse como plataforma experimental basada en que el proteoma refleja la expresión de las moléculas que influyen más directamente en la bioquímica celular; los estudios proteómicos de plantas pueden ser divididos en dos categorías básicas (Rose y Saladié, 2008). La primera división involucra el perfil de proteínas de material biológico con el objetivo de separar, secuenciar y catalogar todas las proteínas posibles de un proteoma particular; en este caso, se establece el conjunto de proteínas de un sistema biológico. La segunda categoría básica del análisis proteómico es denominada proteómica comparativa, donde el objetivo no es identificar todas las proteínas de una muestra particular, sino caracterizar diferencias entre poblaciones de proteínas; se puede comparar el proteoma de dos genotipos diferentes, por ejemplo, el de una planta silvestre contra el de una mutante; también se pueden contrastar los proteomas de los diferentes estados de desarrollo de un genotipo común, o bien, un genotipo común se compara antes y después de la aplicación exógena de uno o más estímulos bióticos o abióticos (Vihinen, 2001).

1.7.1 La expresión diferencial durante el proceso de maduración de frutos

En el desarrollo de la biotecnología se emplean técnicas para lograr un mejor entendimiento de los procesos que ocurren en los organismos en donde la proteómica ha ganado un lugar importante para analizar las funciones de las proteínas; la proteómica permite examinar y clasificar diferentes patrones de acumulación de diversas proteínas en un momento específico de la vida de los organismos (Cánovas *et al.*, 2004).

En años recientes, la investigación en el desarrollo y maduración de los frutos encontró ventajas en el uso de la proteómica. Existen varios estudios dirigidos al análisis de proteínas durante la maduración y han utilizado diferentes partes del fruto, como el mesocarpio de uva y de durazno (Sarry *et al.*, 2004), y de tomate (Kok *et al.*, 2008; Rocco *et al.*, 2006).

En 2010, Nilo *et al.*, por medio de un análisis de electroforesis bidimensional en tres etapas de maduración de durazno, reportaron que las proteínas, tales como endopoligalacturonasa, catalasa, NADP-dependiente isocitrato deshidrogenasa y pectina metilesterasa son muy importantes para distinguir entre fruta madura de otra sobremadura. Además, estos investigadores observaron que las rutas metabólicas que se ven más afectadas durante la maduración son; el metabolismo del carbono, de los aminoácidos y la respuesta al estrés. Estos autores también analizaron una proporción

significativa de las proteínas identificadas, que no habían sido asociadas con el ablandamiento de la pared celular y que se activaban debido al almacenamiento en frío. Por lo tanto, la proteómica comparativa ha demostrado ser una herramienta valiosa para la comprensión de ablandamiento de la fruta y postcosecha (Nilo *et al.*, 2010).

En otros estudios de proteómica, éstos en durazno, se identificaron 106 proteínas en geles 2D y que reportaban cambios en su abundancia durante tres etapas de maduración; éstas estaban relacionados con rutas metabólicas de ácidos orgánicos, estrés, biosíntesis de etileno y reestructuración de la pared celular (D'Ambrosio *et al.*, 2013).

Recientemente (en el 2015), se publicaron diversos avances en la ruta de la señalización e identificación del ácido abscísico (ABA); en frutos climatéricos y no climatéricos se identificó una familia de proteínas fosfatasa tipo2 y la sub-familia de quinasas SnRK2s, las cuales están relacionadas con el transporte de ABA durante la maduración de los frutos (Liu *et al.*, 2015).

La primera vez que se aisló el gen NCED fue a partir del mutante vp14 en maíz (Tan *et al.*, 1997) y se encontró que está relacionado en la biosíntesis de ABA. Este gen se ha clonado y caracterizado a partir de varias especies frutales climatéricos como manzana (Lara y Vendrell, 2000), melocotón (Soto *et al.*, 2013), tomate (Burbidge *et al.*, 1999), y melón (Sun *et al.*, 2012), así como frutas no climatéricas como naranja (Rodrigo y Zacarias, 2006) y uva (Wheeler *et al.*, 2009). Durante la maduración del fruto, la acumulación de ABA parece ser crítica, ya que participa en la regulación de la maduración de frutos climatéricos y no climatéricos, y aunque el papel exacto de ABA sigue siendo oscuro, diversos temas científicos básicos siguen siendo poco claros, como los mecanismos de la expresión temprana de NCED genes que codifican la enzima clave de la síntesis de ABA (Liu *et al.*, 2015). Se sugiere que la manipulación de ABA podría tener posibles aplicaciones comerciales en la maduración para mejorar la calidad de la fruta y los rendimientos.

1.7.2 Obtención de proteínas totales

Existe una diversidad de proteínas dentro de un organismo, por lo que la extracción de los péptidos es un paso fundamental dentro del análisis proteómico. Cada tejido vegetal presenta su nivel de complejidad debido a la baja cantidad de proteínas y la abundancia de compuestos fenólicos, terpenos, pigmentos, carbohidratos, ácidos orgánicos y las enzimas oxidativas y proteolíticas, ello aunado a las concentraciones y calidad requeridas del extracto (Cánovas, 2004).

La obtención de muestras proteicas depende de varios factores, en donde la ruptura de las células o lisis es el principal factor para exponer las proteínas al medio. Por lo general, se utiliza una molienda del tejido con N₂ líquido para evitar la degradación térmica y obtener un polvo fino. Después se utilizan diferentes compuestos químicos para la separación de las proteínas de las diferentes biomoléculas presentes en la célula (Nilo *et al.*, 2010). Por lo tanto, para lograr esto en los protocolos de extracción, se fraccionan las proteínas para aislar, purificar y solubilizar éstas (Rose y Saladié, 2008). Para la disolución de los péptidos se debe tomar en cuenta la naturaleza de la muestra, es decir, las particularidades de las proteínas y el entorno de la muestra, como el pH, la fuerza iónica y la temperatura; por lo tanto, se busca un protocolo de extracción que tenga las mejores condiciones para obtener una muestra proteica de buena calidad (Vihinen, 2001).

1.8 Descripción de la zarzamora

El género *Rubus* comprende cerca de 500 especies altamente heterocigóticas y de número cromosómico variable, existiendo desde especies diploides hasta dodecaploides, y la mayoría presenta reproducción apomíctica (Jennings, 1988). El género *Rubus* se ha subdividido en 12 subgéneros y sólo algunos de ellos se han domesticado. Al subgénero *Idaeobatus* pertenecen las frambuesas o “Raspberries”, las cuales se distribuyen principalmente en Europa y Norteamérica (Graham y McNicol, 1995); al subgénero *Rubus* (antes *Eubatus*) pertenecen las zarzamoras o “Blackberries” y que se distribuyen principalmente en el centro y norte de Europa (Nybom y Kraft, 1995). La mora de Castilla, *R. glaucus*, es originaria de las zonas altas tropicales de América, principalmente de Colombia, Ecuador, Panamá, Guatemala, Honduras, México y Salvador (Franco y Giraldo, 2000); ésta se considera un híbrido, pues combina características de los subgéneros *Idaeobatus* y *Rubus*, y es además un anfidiplóide fértil (Jennings, 1998).

La zarzamora presenta tallos leñosos dotados de espinas, los cuales pueden ser rastreros, semierectos y erectos, con espinas cortas o curvas y/o con vellosidades, las hojas tienden a distribuirse de forma imparipinnada, constando de tres a cinco folíolos los cuales son ovados con bordes aserrados, el haz presenta coloración verde intenso brillante, mientras que el envés es blanquecino con pilosidad, las flores son de hasta tres centímetros de diámetro, las cuales crecen en cimpos al final de las ramas, constan de 5 pétalos variando de blanco a rosado, y 5 sépalos, la infrutescencia forma una polidrupa, la cual consta de diversas drupas individuales arracimadas a un receptáculo (Figura. 2) (Strik *et al.*, 2007). La flor y el fruto están compuesto de drupas, con las que se forman polidrupas (Berg, 2008).



Figura 2. Morfología de la planta de zarzamora.

Cuadro 2. Clasificación Taxonómica de la zarzamora ¹

Dominio	Eukaryota
<u>Reino</u>	<u>Plantae</u>
Subreyno	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
<u>División</u>	<u>Magnoliophyta</u>
<u>Clase</u>	<u>Magnoliopsida</u>
Subclase	Rosidae
<u>Orden</u>	<u>Rosales</u>
<u>Familia</u>	<u>Rosaceae</u>
Subfamilia:	Rosoideae
<u>Género:</u>	<u>Rubus</u>
Variedad	Tupi

¹ Talcott (2007).

Cuadro 3. Contenido nutracéutico de frutos de zarzamora ¹.

Contenido Químico del Fruto de Zarzamora								
Compuesto	Unidad	Cantidad	Vitaminas	Unidad	Cantidad	Minerales	Unidad	Cantidad
Sacarosa	%	0.12-0.26	Acido Ascorbico Total	mg	21	Calcio (Ca)	mg	29
Fructosa	%	2.11-3.38	Tiamina	mg	0.02	Hierro (Fe)	mg	0.62
Glucosa	%	1.58-2.61	Rivoflavina	mg	0.03	Magnesio (Mg)	mg	20
Solidos Solubles	°Brix	10.8-11.4	Niacina	mg	0.65	Fosforo (P)	mg	22
Solidos Totales	%	8.20-13.6	Acido Pantotenico	mg	0.28	Potasio (K)	mg	162
Acido Málico	%	0.06-1.10	Vitamina B ₆	mg	0.03	Sodio (Na)	mg	1
pH	pH	2.55-4.28	Folato Total	µg	25	Zinc (Zn)	mg	0.53
Acidez Titulable	%	0.16-4.22	Vitamina A	IU	214	Cobre (Cu)	mg	0.17
			α-Tocoferol	mg	1.17	Manganeso (Mn)	mg	0.65
			β-Tocoferol	mg	0.04	Selenio (Se)	mg	0.4
			γ-Tocoferol	mg	1.34			
			Δ-Tocoferol	mg	0.9			
			Vitamina K	µg	19.8			

¹ Talcott (2007).

1.8.1 Variedades de zarzamora

En el mundo existen diferentes cultivares (variedades comerciales) mejorados de zarzamora, las que se clasifican según el tipo de cañas. Aquellas variedades de cañas rastreras necesitan de tutores o soportes para levantar los tallas y se puedan llevar a cabo las labores del cultivo, este tipo de variedades tiene frutos más suaves y redondos por lo que su comercialización es en su mayoría para mermeladas y para bases frutales de productos industriales; las variedades de cañas semierectas presentan frutos de mayor consistencia sin embargo presentan frutos redondeados por lo que su comercialización en fresco sigue siendo baja; por último, las variedades de cañas erectas también necesitan de tutores para controlar que las cañas de gran crecimiento se dobles o caigan al suelo, los frutos de estas variedades son los más comercializados debido a que presentan una mayor consistencia (Ochoa 2002)

Las variedades más utilizadas en México son semierectas, entre éstas Cherokee, Apache y Ouachita, y erectas, como Brazos y Tupi, siendo esta última la más requerida en los empaques debido a su buena vida de anaquel (8 a 10 días) (Sánchez, 2008). Tupi fue generada en Pelotas, Brasil por EMBRAPA/Clima Templado y resultó de una cruce entre un material silvestre de Uruguay y el cultivar Comanche; presenta frutos entre 7 y 9 g, firmes y con buen balance entre sabor y dulzura, aunque las semillas son más pequeñas que varios otros cultivares; la producción en promedio es de 3.8 Kg/planta (Clark y Finn, 2002).

1.8.2 Manejo del cultivo de la zarzamora en México

Las plantas de zarzamora son propagadas principalmente de manera asexual; aunque también se hace sexualmente, pero esto solamente con fines de mejoramiento genético (Takeda *et al.*, 2011). La reproducción asexual es principalmente por acodo de tallo y de raíz; éste último es más utilizado para el establecimiento de huertos y consiste en seccionar la raíz en fragmentos de alrededor de 2 cm y someterlos a un tratamiento fungicida con fines de desinfección, después mantenerlos hidratados y en proceso de etiolación para acelerar el proceso de enraizamiento, existe otro método de reproducción asexual *in vitro* obteniendo de ésta plantas libres de enfermedades (Ochoa, 2002).

La zarzamora es tolerante a diferentes tipos de suelo, que van desde arcillosos hasta los arenosos; tolera también un pH en el suelo desde 4.5 hasta 7.5, pero el intervalo que más favorece al crecimiento de esta planta oscila entre 5.5 y 6.5 (Moore y Skirvin, 1990).

Las plantas de zarzamora se adapta a una temperatura no mayor a 35 °C y una mínima de 3.3 °C, soporta una precipitación anual de 1000 a 1600 mm, donde los meses de más lluvia son mayo y agosto con alrededor de 120 días de precipitación y una humedad relativa de 60 y 70 % (Moore y Skirvin, 1990).

La zarzamora se adapta a un intervalo amplio de altitudes, que va desde los 1200 a 3 500 msnm, teniendo un mejor desarrollo entre los 1800 a los 2400 msnm; las necesidades de horas frío son cerca de 150 a 600, dependiendo de la especie y cultivar, las formas erectas son de mayor resistencia al frío que las rastreras (Corzo, 1995).

Una vez establecidas las plantas en huerto, la forma de aplicar el riego es por medio de una "lamina" de 2 cm por semana durante el ciclo de crecimiento vegetativo, y de 5 cm aproximadamente por semana antes de la cosecha; en condiciones de temporal no son necesarios los riegos, siempre y cuando se tenga una precipitación de más de 800 mm anuales (Muratalla, 1999).

Para efecto de la fertilización, se utilizan como fuente de nitrógeno la urea, sulfato de amonio, nitrato de amonio y nitrato de potasio; éstos se aplican como vía foliar y al suelo (Moore y Skirvin, 1990). Entre otros nutrientes necesarios para la zarzamora se encuentra más resaltante el potasio, ya que la deficiencia de éste provoca que el nitrógeno no sea efectivo (Espinoza, 2009).

En México se cuenta con un sistema extensivo de la producción de zarzamora llamado "Producción Forzada" con el objetivo de cubrir el mercado en los meses en que otros países productores no tienen cosecha, esta producción forzada permite un alto rendimiento en los cultivares, se lleva a cabo mediante aplicaciones defoliantes que constan de una mezcla urea o sulfato de amonio (20%), con sulfato de cobre (3%) y aceite agrícola (2%); esta solución se aplica de dos a tres veces después de que emerge la caña principal, después se cortan las puntas de las cañas y los laterales se reducen 30 cm para después aplicarse promotores de crecimiento como giberelinas o fenil ureas, siendo ampliamente usado el Thidiazurón (TDZ); estas son sustancias con actividad citocinínica, que se asperjan aproximadamente tres semanas después de la defoliación promoviendo el brote de nuevas cañas y la floración, para después de 90 a 100 días cosechar los frutos; antes de defoliar nuevamente, se aplica una mezcla de sulfato de zinc, cobre y boro; ello para detener el crecimiento tan acelerado y "sazonar" la planta (Sánchez, 2008).

La práctica anterior se lleva a cabo varias veces durante la temporada de producción para obtener varias cosechas en el temporal de octubre a mayo para el mercado internacional y la última cosecha de Mayo a Junio para el mercado local;

después de esto, las cañas se cortan a nivel del suelo y se dejan crecer para el temporal siguiente (Espinoza, 2009). El sistema de producción usado por los productores mexicanos es único en el mundo, permitiéndoles obtener frutos de alta calidad durante los meses de alta demanda y baja competencia en el mercado Norte Americano, Europeo y Asiático (Calderón-Zavala, 2006; Strik *et al.*, 2007).

1.8.3 Cosecha

La cosecha se realiza una vez que se elimine más del 80 % del rocío de la mañana y debido a que la zarzamora es un fruto climatérico la cosecha se debe realizar una vez que los frutos posean la coloración purpura que los caracteriza, el objetivo de cosechar en plena madurez implica que el fruto haya acumulado los azúcares suficientes para tener un buen balance entre su acidez, dulzor y astringencia (Calderón-Zavala, 2006). El corte de los frutos se realiza de forma manual, tomando éstos cuidadosamente para evitar daños mecánicos que afecten la calidad de los mismos; al mismo tiempo que se colectan, los frutos se colocan en pequeños contenedores en los que se exhibirán en los supermercados; y una vez almacenados en los contenedores, son transportados en cajas de cartón para su posterior envío al empaque, en donde son examinados visualmente, los envases son sellados, empacados en cajas y estivados sobre soportes de madera para evitar el contacto con el piso, después se les retira el calor de campo por medio de aire forzado bajando la temperatura hasta 1°C durante dos horas; finalmente los frutos se embarcan a su destino en camiones con cámaras a bajas temperaturas (Espinoza, 2009).

1.9 Características de los frutos

El desarrollo de los frutos inicia luego de la fecundación de éstos, los óvulos se transforman en semillas, la aparición de semillas inicia la producción de auxinas, las cuales promueven el desarrollo del ovario debido a que estas auxinas promueven la producción de giberelinas, siendo estas las encargadas del desarrollo de los frutos (Brady, 1987). En el desarrollo inicia la división celular, dando como resultado un aumento en el volumen de los frutos; de igual manera, se constituyen diferentes compuestos durante el desarrollo de los frutos; y de manera general, se presenta alteración en: la biosíntesis y la acumulación de pigmentos, la síntesis y acción de las hormonas, la modificación de la textura, la estructura y metabolismo de la pared celular, la modificación de azúcares, ácidos y volátiles que afectan la calidad nutricional, el sabor y el aroma son algunas de las características de los frutos que se van modificando según la etapa del desarrollo en que se encuentren éstos (Asif y Nath, 2005; Giovannoni, 2001, 2004). Estos cambios físicos y químicos pueden ser

valorados mediante una serie de técnicas de laboratorio para cuantificar cambios que indican un avance durante el desarrollo de los frutos (Giovannoni, 2004)

1.9.1 Postcosecha

Los frutos contienen una alta actividad metabólica, comparados con las semillas; esta actividad continúa durante la cosecha y poscosecha. Dependiente de este metabolismo se encuentra la vida de anaquel, que es el resultado de los cambios en el color, aroma, sabor y firmeza, lo que representa un problema para el manejo y transporte del fruto fresco (Brady, 1987). Los frutos con importancia comercial, y sobre todo los que se comercializan fuera del país de origen, presentan la gran dificultad de ser llevados hasta el consumidor final con las óptimas condiciones de calidad; el principal problema es mantener el transporte adecuadas para que logren llegar al mercado final en buenas condiciones y no se tengan mermas. Entre las estrategias para manejar los frutos en postcosecha están las siguientes: cosechar los frutos en etapas tempranas de maduración o al inicio de ésta, y transportar en atmósferas controladas de temperatura y cantidad de CO₂; sin embargo, muchos frutos no pueden ser manejados usando estos métodos debido a su actividad metabólica, por lo que el manejo de frutos con metabolismo diferente puede venir de una mejor comprensión de la bioquímica y la biología molecular de la maduración. Por lo tanto, es de interés científico identificar los mecanismos claves involucrados en la regulación de este proceso y comprender cómo el metabolismo completo del fruto es transformado para generar los atributos asociados con la maduración (Prasanna *et al.*, 2007), lo que a la vez permitirá la manipulación de las características de calidad y nutricionales asociadas a este proceso (Giovannoni, 2001).

III. JUSTIFICACIÓN

Al comercializar los frutos de zarzamora se presentan diferentes retos. Uno de ellos es la corta vida de anaquel, por lo que es deseable desarrollar estrategias de control de la maduración; sin embargo, se tiene poca información sobre este complejo proceso en este cultivo; y para iniciar una mejora en la maduración del cultivo, es necesario conocer los factores que afecten al mismo. Se sabe que se presentan cambios físicos y bioquímicos durante el desarrollo de los frutos, los cuales están regulados por diferentes genes y proteínas. Es por esto que se pretendió conocer las diferentes condiciones que se presentan durante el desarrollo y maduración de los frutos de zarzamora, a través de análisis fisicoquímicos y proteómicos en estas etapas; ello con la finalidad de tratar de comprender la fisiología de la maduración en estos frutos.

IV. OBJETIVO

Caracterizar el proceso de maduración de frutos de zarzamora variedad Tupi.

4.1 Objetivos Particulares

Establecer una escala morfológica para el estudio del proceso del desarrollo de los frutos de zarzamora var. Tupi.

Evaluar las propiedades fisicoquímicas de los frutos de zarzamora durante el proceso del desarrollo.

Identificar los cambios que ocurren en los perfiles de acumulación de proteínas durante el proceso de maduración.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Descripción del sitio de colecta

La colecta de frutos de zarzamora “Tupi” se llevó a cabo en el huerto llamado “El Potrero”, en el Fresno, localidad del municipio de Ziracuaretiro, Michoacán (Figura. 4). “El Potrero” es propiedad del Sr. Silvano Bailón Torres, en donde se tiene una superficie de 4 ha; la edad de la unidad de producción es de siete años y está establecida en un sistema de producción en bajo túnel con control en el manejo agronómico y en las condiciones microclimáticas que disminuyen la variabilidad fisiológica entre plantas.

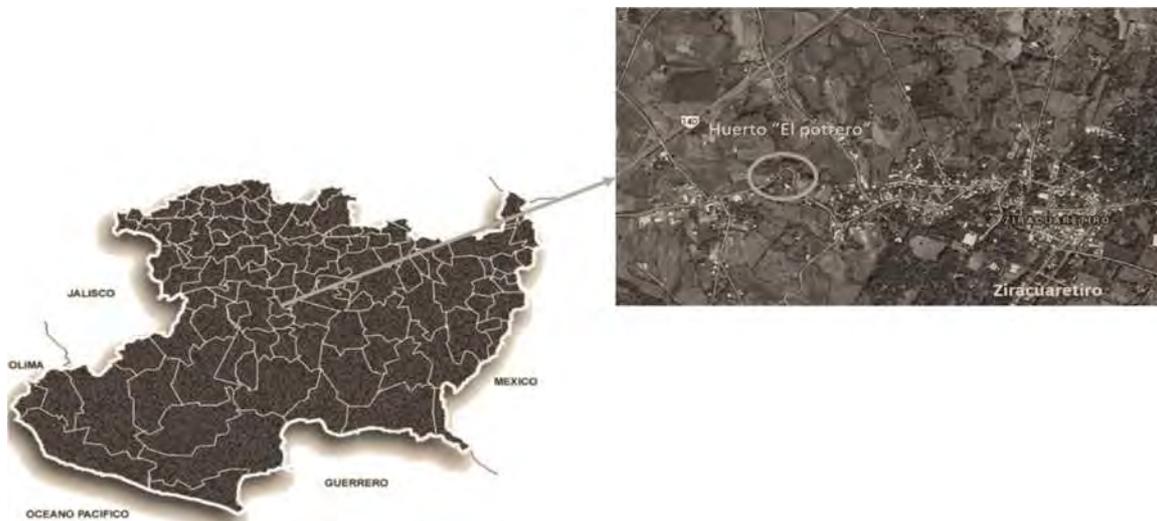


Figura. 3 Ubicación del sitio de colecta. “El Fresno”, municipio de Ziracuaretiro, Mich. (19° 25' 02" LN y 101° 55' 42" LO; 1386 msnm de altitud).

Para determinar los estadios de desarrollo de frutos de zarzamora “Tupi” se tomó en cuenta la escala morfológica reportada anteriormente por nuestro grupo de trabajo (Chávez-Bárceñas *et al.*, 2012), en la cual se describe seis etapas de maduración, sin embargo se exploraron otras posibilidades bajo el análisis de posibles etapas intermedias adicionales y posteriores a la madurez de cosecha.

5.2 Colecta de material biológico

Para seleccionar el sitio dentro del huerto en donde se realizó la colecta de todos los frutos se eligieron dos surcos ubicados en el centro del huerto eliminando el efecto lindero y en la parte interna de los surcos se seleccionaron 10 plantas de tamaño y desarrollo similares y equivalentes a la mayor parte de las plantas del huerto. De cada planta se colectaron 176 frutos de diferentes etapas de desarrollo, obteniendo un total de 1 760 frutos, los cuales se separaron para los análisis fisicoquímicos y para los análisis proteómicos, quedando de la siguiente manera: 960 frutos para análisis fisicoquímicos y 800 para análisis proteómicos. Los frutos destinados a análisis proteómicos fueron almacenados a -70 °C hasta su análisis.

5.3 Análisis Fisicoquímicos

Los estudios fisicoquímicos se llevaron a cabo en el laboratorio de Bromatología y los análisis realizados fueron: peso, talla, firmeza, pH, sólidos solubles totales (SST) y acidez total titulable (ATT). Se utilizaron 12 frutos en cada estadio de cada planta, agrupados éstos en cuatro réplicas de tres frutos cada uno, dando en total 960 frutos para los ensayos fisicoquímicos. Los ensayos no destructivos fueron realizados en frutos que posteriormente se aprovecharon para utilizarlos en ensayos destructivos.

5.3.1 Peso y talla

El peso de cada fruto se determinó en una balanza analítica MEDI DATA modelo "PS-5". El largo y ancho de los frutos fue determinado por medio de un vernier. El promedio de los datos de tres frutos fue considerado el peso y talla de una réplica.

5.3.2 Firmeza

Prueba de penetración

Los frutos utilizados para tomar los datos de peso y talla se utilizaron para evaluar firmeza. Para el análisis de firmeza se utilizó la prueba de penetración, en la cual se determinó la resistencia de los frutos a la penetración a través del pericarpio. Los ensayos se realizaron con el texturómetro TA.XT2i (Stable Micro Systems, Godalming, UK), para lo cual se empleó una probeta o vástago de 3 mm de diámetro (Figura 4), de acuerdo a las especificaciones recomendadas por Holcroft y Kader (1999). La distancia de penetración que se utilizó fue de 3 mm y la velocidad de descenso de 0.3 mm/s. los resultados se registraron como fuerza en Newtons.



Figura. 4 Análisis de textura de frutos de zarzamora.

Texturómetro TA.XT2i (Stable Micro Systems, Godalming, UK)

Una vez que se determinó la firmeza, los frutos fueron procesados para obtener el néctar. Para ello, los tres frutos de cada réplica (aproximadamente 5 g) se molieron dentro de un tamiz de uso común. El néctar obtenido se colectó en un vaso de precipitados de 100 mL, se determinaron los sólidos solubles totales y después se aforó a 100 mL con agua destilada estéril para determinar la acidez total titulable y pH.

5.3.3 Sólidos solubles totales

Para determinar la concentración de sólidos solubles totales, se colocó una gota del néctar de los frutos en refractómetro Atago, modelo 300003; los resultados se expresaron en porcentaje de grados Brix ($^{\circ}\text{B}$) (AOAC, 2000).

5.3.4 pH

Para evaluar el pH, se tomó la lectura del néctar diluido, utilizando para ello un potenciómetro HANNA Microprocessor-based pH/mV/ $^{\circ}\text{C}$ modelo pH 211, con un nivel de -2 a 16 pH a una temperatura ambiente (Método 02-52, AOAC 1996)

5.3.5 Acidez Total Titulable

La acidez total titulable se determinó de acuerdo al método oficial de la AOAC (1996), por titulación con hidróxido de sodio (NaOH). Para ello, se utilizó el néctar diluido, tomando 15 mL y agregando tres gotas de fenolftaleína al 1%. Posteriormente se agregó el volumen de NaOH al 0.1 N, requerido en cada muestra para elevar el pH a 8.5, lo cual se logra al obtener un viraje de incoloro a rosado (que persista por 15 a 30 segundos) en la coloración de la solución. Los resultados se expresaron como porcentaje de ácido cítrico utilizando la siguiente fórmula:

ECUACIÓN 1. $(A-B) (C) (N) (F) = \text{porcentaje de acidez titulable}$.

Dónde: A = mL de NaOH necesarios en la titulación de la muestra.

B = mL de NaOH necesarios en la titulación del blanco.

C = Meq de ácido cítrico.

N = Normalidad utilizada.

F = Factor de dilución

5.4 Análisis de los resultados fisicoquímicos

Se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA), y cuando hubo significancia estadística, se realizó la prueba de Tukey, con un nivel de confianza de 95 % ($\alpha=0.05$), usando el paquete de diseños experimentales JMP 6.0.0 (Statistical Discovery TM From SAS Organization).

5.5 Análisis proteómicos

En la obtención de las proteínas totales de zarzamora se utilizaron frutos en diferentes estados de maduración (E4, E6 y E7), procedentes de 5 plantas después de separar los frutos se sumergieron en N₂ líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. La extracción de proteínas totales se realizó en base a lo reportado por Isaacson *et al.* (2006), los cuales se describen a continuación.

5.5.1 Protocolo de extracción con Fenol

Las muestras de frutos (1g) se molieron en un mortero previamente enfriado con N₂ líquido, hasta obtener un polvo muy fino, el cual se resuspendió en 3 mL de la solución de extracción (0.7 M de sacarosa; 0.1 M KCl; 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0 y 50 mM EDTA; el β -mercaptoetanol al 2% y el 1% de inhibidores de proteasas). A esta mezcla se adicionó un volumen de fenol saturado con Tris-HCl, pH 8.0 y se separó en 6

fracciones de 500 μ L para una mejor manipulación. Después de agitar durante 15 min se centrifugaron las muestras por 30 min a 6 000 rpm a una temperatura de 4 °C. A la fase fenólica recuperada se le adicionó un volumen igual de solución de extracción con el agente reductor y los inhibidores de proteasas, se agitó durante 15 min a 4 °C y se volvió a centrifugar para recuperar la fase fenólica. Este lavado con el amortiguador se repitió dos veces y se pasó a la fase de precipitación de las proteínas. Al sobrenadante se agregó 1.2 mL de acetato de amonio (0.1 M) en metanol y se dejó a - 20 °C por lo menos durante dos horas. El precipitado se recuperó por centrifugación a 7 000 rpm durante 30 min a 4 °C, y se lavó 5 veces con 700 μ L de metanol absoluto, con agitación en vortex, y se centrifugó por 15 min a 8 000 rpm a 4 °C (Isaacson *et al.*, 2006). El precipitado recuperado se dejó secar durante 30 s a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en la solución de Isoelectroenfoco, la cual se describe en el apartado 5.5.6 Isoelectroenfoco.

5.5.2 Protocolo de extracción con TCA/Acetona

Las muestras de frutos (1g) se molieron en un mortero previamente enfriado con N₂ líquido, hasta obtener un polvo muy fino, el cual se pasó a 3 mL de TCA, se centrifugó por 30 min a 7000 rpm a 4 °C, se recuperó el sobrenadante, se precipitó con 500 mL de acetona absoluta y se dejó reposar al menos 2 h a -20 °C (Isaacson *et al.*, 2006). El precipitado se recuperó por centrifugación a 6 000 rpm y se lavó dos veces con 500 μ L acetona fría, agitando en vortex por 10 min. La pastilla, recuperada por centrifugación durante 10 min a 6 000 rpm, se dejó secar por 30 s y se resuspendió en solución de Isoelectroenfoco la cual se describe en el apartado 5.5.6 Isoelectroenfoco.

5.5.3 Limpieza de proteínas totales

Para eliminar excedentes de compuestos fenólicos y sales de los extractos obtenidos, se utilizó un protocolo de limpieza que consistió en agregar 800 μ L de acetona 100 %; después de agitar durante 10 min, se volvió a precipitar la proteína. El precipitado, recuperado por centrifugación a 12 000 rpm durante 30 min, se lavó dos veces con 150 μ L de acetona al 80 %, se agitó hasta desprender la pastilla de las paredes del tubo y se centrifugó por 2 min a 12 000 rpm. Una vez que se eliminó la acetona y se agregaron 100 μ L de solución de resuspensión (amortiguadora de Isoelectroenfoco), se cuantificó la proteína.

En múltiples análisis de proteína total se establece que la limpieza de la muestra es un paso importante debido a que diferentes compuestos como fenoles, sales o impurezas pueden afectar el isoelectroenfoco (Isaacson *et al.*, 2006). El protocolo de

limpieza que se probó fue utilizando acetona al 100 %, para lo cual la pastilla obtenida se resuspendió en solución de isoelectroenfoque y se agregaron 800 μ L de acetona al 100 %.

5.5.4 Cuantificación de proteína

Las proteínas totales se cuantificaron utilizando el protocolo descrito por Bradford (1976). Para ello, se realizó una curva patrón de albúmina sérico- bovina (BSA) con concentraciones de 1 a 10 μ g y se tomó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Beckman Du-50. Para la cuantificación de proteína de los extractos se tomaron alícuotas de 1 y 0.5 μ L para conocer la concentración de proteínas de los diferentes estadios de maduración.

5.5.5 Electroforesis bidimensional (2-DE)

La electroforesis bidimensional consta de una separación de las proteínas, con una dimensión en base a su pI (isoelectroenfoque), y en una segunda dimensión, en base a su peso molecular (PM) por medio de un gel poliacrilamida-SDS (O'Farell, 1975).

5.5.6 Isoelectroenfoque

Las pastillas obtenidas con y sin lavado con acetona se resuspendieron en la solución de rehidratación, la cual contenía urea 7 M, thiourea 2 M, CHAPS 4 %, con DTT (2M) al 1 % y anfolitos al 0.5 %; éstas se dejaron a temperatura ambiente durante 30 min. Después se agregó azul de bromofenol a una cantidad mínima para teñir la solución, se centrifugó por 2 min a 12 000 rpm y se recuperó el sobrenadante (en el caso de existir pastilla). El sobrenadante obtenido se agregó al gel de 7 cm ó 18 cm, el cual se rehidrato durante 12 h. Una vez terminada la rehidratación se prosiguió al IEF, utilizando el Ettan IPGphor 3 de la marca GE Healthcare, con geles de 7 y 18 cm de la marca Bio-Rad y con un gradiente de pH inmovilizado de 4-7. Las condiciones de enfoque para cada uno de los geles se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Condiciones de Isoelectroenfoque.

Gel IEF	Voltaje	Tiempo
7 cm pH 4-7	250 v	1 h
	500 v	30 min
	1000 v	30 min
	9 000 v	Hasta el voltaje requerido
18 cm pH 4-7	100 v	15 min
	250 v	30 min
	500 v	30 min
	1 000 v	1h
	9 000 v	Hasta el voltaje requerido

5.5.7 Equilibrio de los geles de IEF

Una vez terminado el IEF, los geles se agitaron durante 15 min en solución de equilibrio (urea 6 M, SDS 2 %, amortiguador tris/HCl 0.05 M, pH 8.8, glicerol 30 % y DTT 1 %). Transcurrido este tiempo, se retiró la solución y se agregó de nuevo la solución de equilibrio, cambiando el DTT por Iodoacetamida 2.5 % y dejando en agitación moderada durante 15 min.

5.5.8 Separación en la segunda dimensión

Al término del equilibrio de los geles, éstos se colocaron en la superficie de un gel de poliacrilamida-SD, previamente polimerizado, el cual contenía una parte concentradora y otra separadora con las condiciones siguientes (Laemmli, 1970):

- a) Gel de separación (12 %). Mezcla en agua: 30 % de mezcla de acrilamida (acrilamida 37.5 %; N, N'-metil bisacrilamida 1 %); 25 % Tris 1.5 M, pH 8.8; SDS 0.1%; persulfato de amonio 0.5 %; TEMED 0.05 %. La mezcla se homogenizó y se cargó en una cámara electroforética vertical de Bio-Rad, USA, se mantuvo a temperatura ambiente hasta permitir la polimerización.

- b) Gel concentrador (4 %). Mezcla en agua: 13 % mezcla de acrilamida (30 %); 12.5 % Tris 1.0 M, pH 6.8; SDS 0.1 %; persulfato de amonio 0.1 %; TEMED 0.1 %. La mezcla se cargó en la cámara, sobre el gel separados a temperatura ambiente hasta polimerizar.

Al colocar el gel de IEF sobre el gel poliacrilamida-SDS, se procuró no generar burbujas, se colocó el marcador de peso molecular en la parte superior derecha y se sella con agarosa al 0.5 %, teñida con azul de bromofenol. El gel se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó la solución de corrida, la cual constaba de Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%. La electroforesis se realizó a 90 Volts durante 25 min, posteriormente se elevó el voltaje a 100 v para dejarlo correr durante 16 h aproximadamente.

5.5.9 Tinción

En la técnica de tinción se utilizaron compuestos aniónicos para detectar de 5 a 10 µg de proteína utilizando el azul de Coomasie R350 el cual venía en presentación de pastillas "Phast Gel Blue R". La pastilla se disolvió en 80 mL de agua y después de agitar durante 10 min se agregaron 120 mL de metanol absoluto. Después de filtrar en papel 3M y adicionar 150 mL de ácido acético al 20 %, se aforo a 1 L. Una vez que se terminó la 2D se pasó el gel a fijación durante 20 min con metanol 40 % y ácido acético 10 %. Terminando el tiempo, se retiró la solución y se agrega solución de tinción, en agitación moderada durante 25 min y por último se destiñó el gel con una solución que contiene ácido acético al 10 %. Finalmente los geles se enjuagaron dos veces durante 10 min con agua destilada para eliminar el exceso de ácido acético (Sambrook *et al.*, 1989).

5.5.10 Análisis de imágenes

Los perfiles de las proteínas en los geles 2D se digitalizaron usando el densitométrico "ImageScanner" calibrado ("Amersham Biosciences"). Las imágenes fueron obtenidas con el programa LabScan 5.0 (powered by Melanie), con una resolución de 300 puntos por pulgada (DPI) y 16 bits por pulgada.

Los perfiles electroforéticos se analizaron mediante el programa Melanie (7.0 GeneBio), diseñado para el análisis de proteínas en geles de dos dimensiones. Las imágenes se cargaron al programa y se almacenaron dentro de un proyecto llamado

Zarza2014, el cual constaba de carpetas de “matchset” principales y “matchset” secundarios, que funcionan de acuerdo a un orden jerárquico. Dentro de los “matchset” secundarios se almacenaron las imágenes separadas por condición a analizar; en este caso fueron por estadios de maduración (Figura 5 A). Se establecieron los parámetros que permitieran detectar claramente las manchas que correspondieran a proteínas y no a defectos del gel, fondo, o algún otro artefacto. Los parámetros de detección de proteínas se ajustaron según el fabricante (“smooth”, “saliency” y área mínima), con la finalidad de descartar manchas que no correspondieran a proteínas y con ello detectar la mayor cantidad de manchas por gel (Figura 5 B). Al ajustar el valor del parámetro “smooth” se permite detectar las manchas reales y dividir las manchas que se sobreponen. Con el parámetro “saliency” se indica qué tanto sobresale una mancha respecto a su entorno. Las manchas reales tienen normalmente valores de “saliency” altos. Mediante el parámetro del área mínima, se eliminan las manchas que tienen un valor inferior al especificado (expresado en número de píxeles).

Para la asignación del peso molecular de las proteínas en los geles, se tomó como referencia el peso molecular de cada una de las proteínas de los marcadores de peso molecular (“BenchMark Ladder, Invitrogen”) que se incluyeron en el gel. Para la asignación del punto isoeléctrico (pI), se consideró que el pH varía a lo largo del gel de isoelectroenfoque, tomando en cuenta que se utilizaron geles con un gradiente lineal de pH de 4 a 7; se asignó el valor de pH=4 en el extremo izquierdo del gel y pH=7 en el extremo derecho.

Para poder detectar los cambios en el proteoma, ello mediante la comparación de los tratamientos, se procedió con la sobreposición de los geles (en inglés: “matching”). La sobreposición consiste en comparar las imágenes de los geles para encontrar las manchas que corresponden a la misma proteína en los diferentes geles. El algoritmo de la sobreposición siempre empieza de una imagen de referencia y busca la mancha correspondiente en las otras imágenes de los geles.

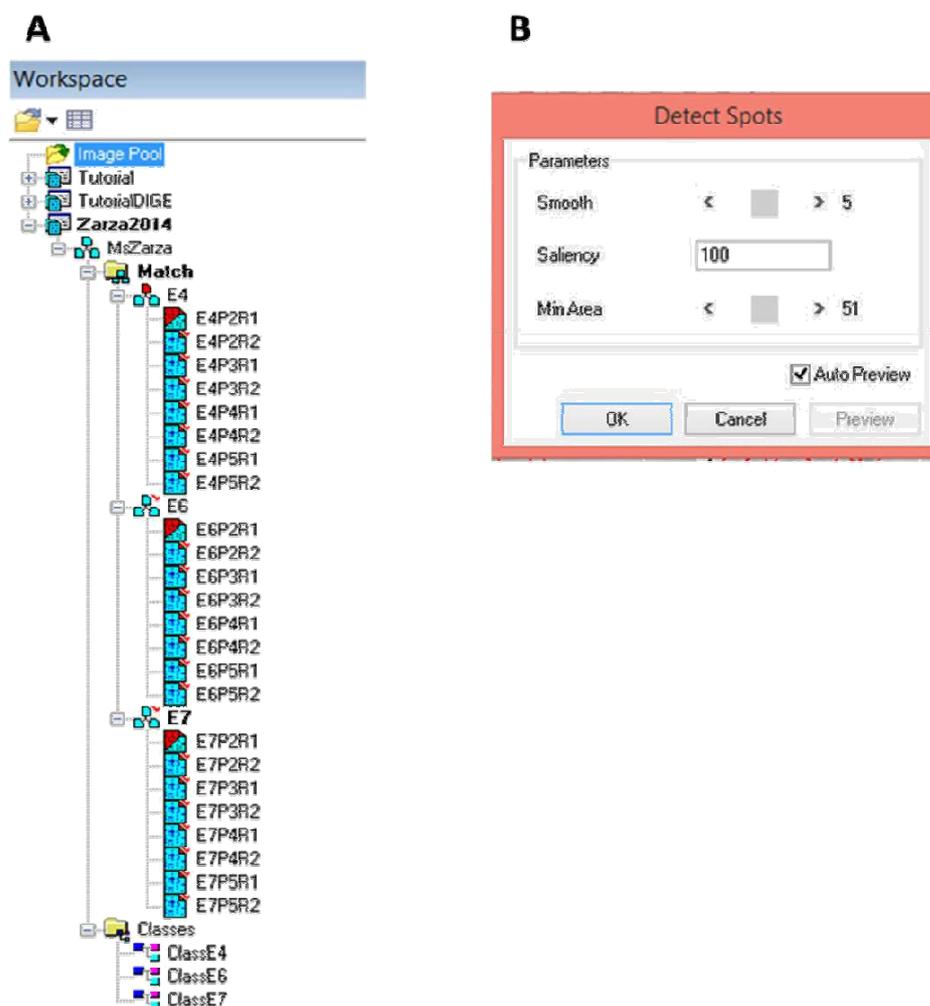


Figura 5. Imagen del almacenamiento de imágenes y los parámetros de detección utilizados en el programa Melanie 7.0. A se indica el orden en el cual fueron almacenadas las imágenes de los geles y las diferentes carpetas que las contienen. **B** se muestran los valores establecidos para la detección de spots.

A las manchas que coincidieron se les llamó “manchas relacionadas”, puesto que éstas representaban la misma proteína en los diferentes geles. A cada grupo de manchas relacionadas se le denomina “match”. Un *match* está compuesto de n número de manchas, con el mismo pI (punto Isoeléctrico) y masa molecular presente en n número de geles. Cada “match” está identificado con un número, el cual es asignado por el programa.

Una vez obtenidos los “matchs”, el siguiente paso es la edición manual de los *matches*. Debido a que el programa detecta los spots en escalas de grises, algunos *matches* se pueden confundir con artefactos de la imagen o irregularidad de los geles; por lo tanto, se revisó visualmente que cada *matches* coincidiera en número y posición en todas las imágenes. Cuando se encontraron *matches* con algún spot que no coincidía en alguno de los geles en PM o p, se desagrupó el spot; y por otro lado, cuando se encontraron spots que no fueron agrupados en algún *matches*, pero que correspondían a uno de éstos, se agrupó el spot al *match* correspondiente.

Debido a que en la técnica 2-DE se presentó una gran variabilidad entre geles y un alto índice de valores perdidos, se planteó una estrategia para tratar de disminuir la presencia de valores perdidos. Así que luego de la edición de *matches* se aplicó un filtro para seleccionar sólo aquellos *matches* que estuvieran presentes en por lo menos el 80 % de los geles por condición de maduración. Los *matches* que pasaron este filtro se analizaron estadísticamente para conocer los cambios de abundancia significativos, ello en respuesta a la maduración de zarzamora.

5.5.11 Análisis estadístico multivariado

Los datos obtenidos de la abundancia de cada “match” se procesaron para realizar el análisis estadístico de componentes principales. Todos los análisis y el procesamiento de los datos antes del análisis fueron realizados por el Dr. Carlos E. Rodríguez López y la Dra. Rocío I. Díaz de la Garza, en el Centro de Biotecnología del Tecnológico de Monterrey, en Monterrey, Nuevo León.

Primeramente se hizo la asignación de los valores perdidos. Cuando un “match” estaba presente sólo en una condición experimental, todos los valores faltantes de la condición donde no estaba presente fueron sustituidos por ceros; sin embargo, cuando este factor estaba presente en por lo menos seis de las ocho réplicas, se sustituyó el valor de cero por el volumen mínimo detectado entre 3 (MIN/3), suponiendo así que los valores en cero se debían a que éstos no se presentaron en los geles. Finalmente, los datos se normalizaron mediante la transformación de datos por logaritmo de Quantile (logQ), que consiste en transformar los valores de las intensidades en cada spot y en cada muestra, sin cambiarles el orden, de manera que resulten con idéntica distribución. Esta normalización de los datos mejora la normalidad de la muestra y corrige la heterocedasticidad y se aplica para experimentos con alto número de valores perdidos (Searle *et al.* 1992), como fue en el presente caso.

Los análisis multivariados están enfocados en reducir la complejidad de un conjunto de datos al mínimo (reducción de dimensionalidad) y hace posible definir el

proceso biológico que está detrás de las variaciones, el análisis multivariado que se realizó en el presente proyecto fue el Análisis de Componentes Principales (PCA), el cual transforma las variables observadas en un nuevo conjunto de variables independientes, conocidas éstas como “componentes principales” (PCAs). Estos componentes reducen el número de dimensiones y pueden utilizarse para visualizar la estructura de los datos (Valledor y Jorrín, 2012).

Al grupo de datos procesados se le aplicó un análisis de componentes principales (PCA, “Principal Component Analysis”) y posteriormente una agrupación jerárquica (HCA, “Hierarchical Clustering Analysis”) por el método de Ward, usando distancias euclidianas basada en los resultados del PCA. Además, se determinó la significancia de la contribución de cada mancha a los dos primeros componentes principales (PC’s) y a los grupos o “clusters” obtenidos en el HCA; éstos se seleccionaron para la identificación por espectrometría de masas las manchas con una $p < 0.05$.

I. RESULTADOS

6.1 Estadios del desarrollo de los frutos de zarzamora

Se lograron seleccionar ocho estadios de desarrollo de los frutos (Figura 6). En el primer estadio (E1), el 100 % de las drupelas fueron de color verde oscuro, con un diámetro promedio de 0.9 cm y un peso de 1.25 g. En el estadio dos (E2) presentó el 80 % de sus drupelas verdes y el 20 % restante en coloraciones amarillas, con un peso promedio de 2.4 g, un diámetro de 1.4 cm y una longitud de 1.8 cm. En el estadio tres (E3) el 100% de las drupelas fueron de color amarillo, con un peso de 4.1 g, un diámetro de 1.6 cm y una longitud de 2.3 cm. El estadio cuatro (E4) fue 90 % rojo, con un diámetro de 1.9 cm y longitud de 2.6 cm. En el estadio cinco (E5) los 60 % de las drupelas fueron de color rojo, y alrededor del 40 % de tonos rojo oscuros, con un peso promedio de 7.0 g, una longitud de 2.6 cm y un diámetro de 2.0 cm. El estadio seis (E6) presentó un 60 % de drupelas negras y un 40 % rojas; este estadio, identificado por los productores como "etapa de color marrón", tuvo un peso promedio de 7.2 g, un diámetro de 2.0 cm y una longitud de 2.6 cm. El estadio siete (E7) presentó el 100 % de las drupelas en color negro, y con frutos muy brillantes, que son el punto óptimo para el consumo; presentó también un diámetro de 2.2 cm, una longitud de 3.0 cm y un peso promedio de 9.9 g. Por último, el estadio ocho (E8) presentó una coloración 100 % negra, pero opaca y muy sensible al tacto; con un peso de 10.1 g, un diámetro de 2.4 cm y una longitud de 2.9 cm (Figura 7); este último estadio es utilizado comúnmente para la industria de alimentos (Sánchez 2008).

Con base en las características mencionadas de cada estadio de maduración, se lograron distinguir las etapas de crecimiento de los frutos de zarzamora en campo, identificando que del E1 al E4 se obtiene el mayor crecimiento y representando un 85 % del total de la altura de los frutos durante su desarrollo. El mayor crecimiento (85 % del total de la altura de los frutos) se presentó en los estadios E1 al E4; también se identificó que en el estadio E4 se inicia el cambio de coloración de los frutos.

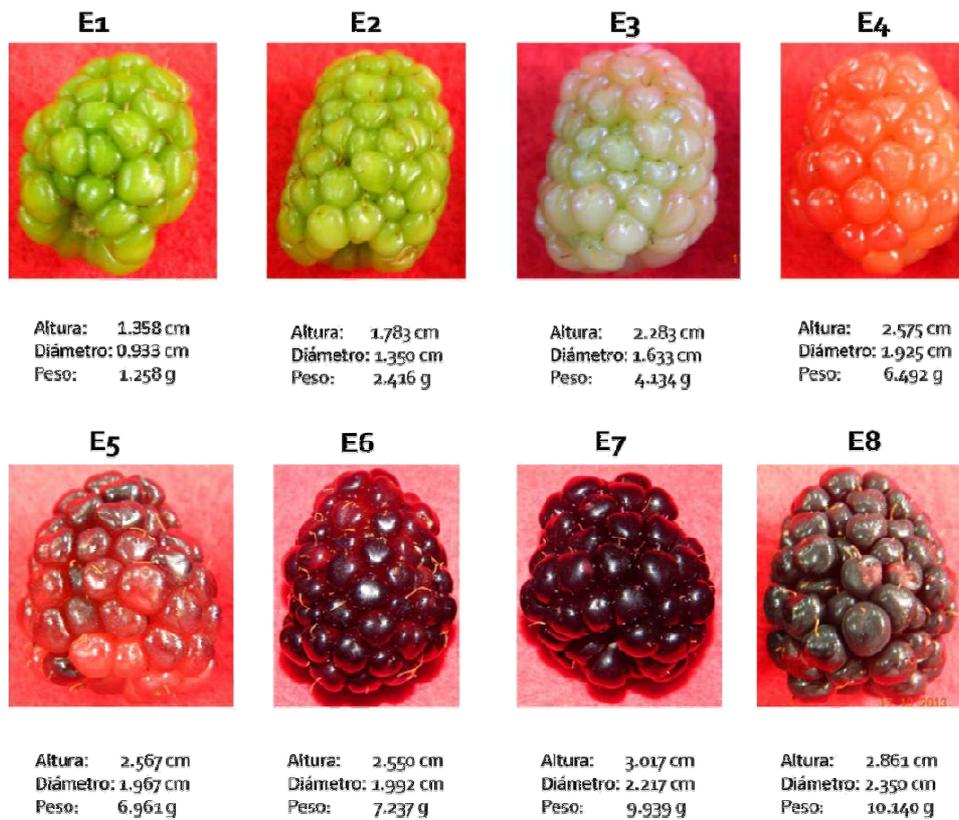


Figura 6. Escala de maduración de frutos de zarzamora. La colecta se realizó en Ziracuaretiro Michoacán.



Figura 7. Escala de peso de los frutos de zarzamora var. Tupi. Las literaturas distintas indican la diferencia entre los tratamientos.

6.2 Propiedades fisicoquímicas por estadio

Una vez tomada la talla y peso de los frutos, se procedió a realizar los análisis fisicoquímicos antes descritos, en donde se observó que el desarrollo de los frutos se manifiesta de forma escalonada, ya que el peso de éstos mostró diferencia estadística en todos los estadios de crecimiento, lo cual comprueba la diferencia observada en campo.

6.2.1 Firmeza

La firmeza es un indicador del ablandamiento de los frutos. Al obtener los valores de los ocho estadios del desarrollo de los frutos de zarzamora, se observaron diferencias estadísticas entre ellos, resultando el E3 como el estadio más firme, con una fuerza de penetración de 2.048 N, mientras que el estadio menos firme lo fue el E8, con una fuerza de 0.071 N (Figura 8).



Figura 8. Cambios de firmeza durante los estadios de desarrollo de los frutos. Las letras diferentes indican diferencia estadística significativa.

6.2.2 Cambios en los SST

Respecto a los sólidos solubles totales, se encontraron diferencias estadística entre algunos estadios (Figura 9), mostrando que—el E3 es la etapa con menor contenido de SST, con una media de 4.8 % de ° Brix y que los últimos estadios (E7 y E8) fueron los de mayor contenido de sólidos, lo cual nos indica que dentro de las

primeras etapas del desarrollo de los frutos de zarzamora se tiene una correlación de maduración y acumulación de SST.



Figura 9. Cambios en la concentración de sólidos solubles totales (SST) de los frutos de zarzamora. Las letras diferentes indican diferencia estadística significativa.

6.2.3 pH

Como se observa en la figura 10, la acidez en el néctar de los frutos se mantiene en un pH entre 3.1 y 3.75 con pocas variaciones durante el desarrollo, siendo ligeramente más alcalino en el E1, los estadios E3 a E6 son los más ácidos y en el E8 el pH se incrementa ligeramente, sin embargo, a excepción del E1, el resto de los estadios se concentran estadísticamente en un mismo grupo.

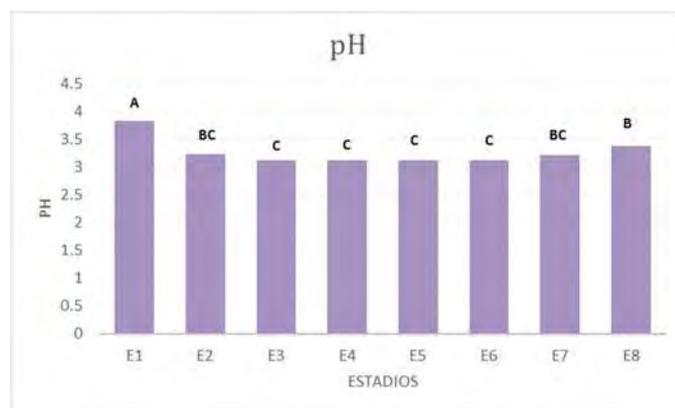


Figura 10. Cambios en el pH del néctar de los frutos de zarzamora. Las letras diferentes indican diferencia estadística significativa.

6.2.4 Acidez Total Titulable

La mayor concentración de ácido cítrico en los frutos se observó en los estadios E2 y E3 (Figura 11), lo cual es inverso a los resultados de los sólidos solubles totales (Figura 9).

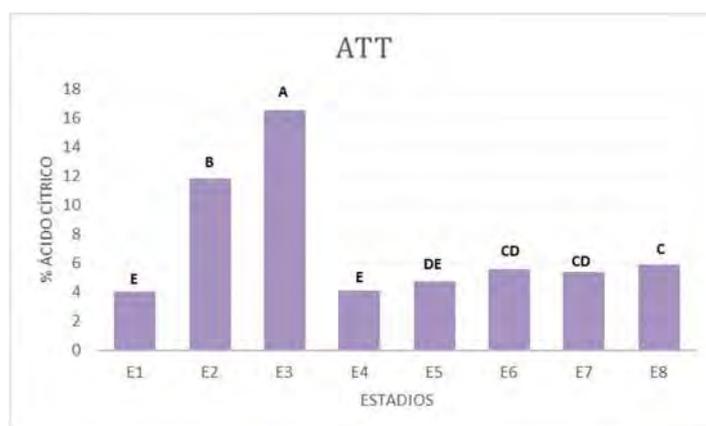


Figura 11. Cambios en el contenido de ácido cítrico en el néctar de frutos de zarzamora. Las letras diferentes indican diferencia estadística significativa.

6.3 Etapas de crecimiento y maduración durante el desarrollo de los frutos de zarzamora

Con base en los resultados de los análisis fisicoquímicos, se lograron distinguir dos etapas: la primera de crecimiento y la segunda de maduración. La primera etapa que comprendió del E1 al E4, periodos en los que prevaleció el crecimiento y desarrollo del fruto, con un incremento del peso de 5 g (Figura 7), y los mayores valores de firmeza (Figura 8); los sólidos solubles se mantuvieron sin diferencias estadísticamente significativas (Figura 9) y la acidez titulable se incrementó drásticamente durante este periodo (Figura 11). En la segunda etapa (E5 al E8), el aumento de peso fue solo de 2 g (Figura 7), la firmeza (Figura 8) disminuyó drásticamente, el incremento en sólidos solubles fue de 75 % respecto a lo acumulado en el E4 (Figura 9) y la acidez titulable se manifestó estable y por debajo de 6 % de ácido cítrico (Figura 11). Estos resultados sugieren que los estadios E4, E6 y E7 representan etapas de cambios significativos para el estudio más profundo de los procesos de maduración de zarzamora, al menos en la var. "Tupi".

6.4 Análisis Proteómicos

Para el análisis proteómico del proceso de maduración de los frutos de zarzamora (var. Tupi) se seleccionaron tres estadios contrastantes: E4, E6 y E7. E4 se eligió como el estadio de mayor desarrollo durante la etapa de crecimiento del fruto, el E6 como una etapa intermedia de maduración y el E7 como un estadio de madurez de consumo. El E8 no se consideró debido a que es un estadio con frutos que han sobrepasado una etapa de madurez y comienzan a presentar daños por intemperismo, además de haber perdido firmeza y mostrar una coloración negra opaca.

6.4.1 Extracción de proteínas totales

Para estandarizar los protocolos de extracción y análisis de proteínas, se utilizaron frutos del E8; ello debido a que en esta etapa se han observado la mayor cantidad de compuestos fenólicos (Salmeron, 2008), además de que se requiere eliminar dichos compuestos de las muestras para lograr la electroforesis bidimensional adecuada (Canovas *et al.*, 2004).

En la extracción con fenol a partir de 1.0 g de tejido vegetal, se obtuvo una pastilla de color blanco con una concentración de $7.99 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, mientras que, con la misma cantidad de material vegetal, al utilizar la extracción con TCA/Acetona se observó una pastilla de color rojizo y de mayor volumen (Figura 12), con una concentración de péptidos de $6.20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Al resuspender ambas pastillas, se observó que la de extracción de fenol se disolvió más fácilmente que la obtenida por la extracción de TCA/Acetona.

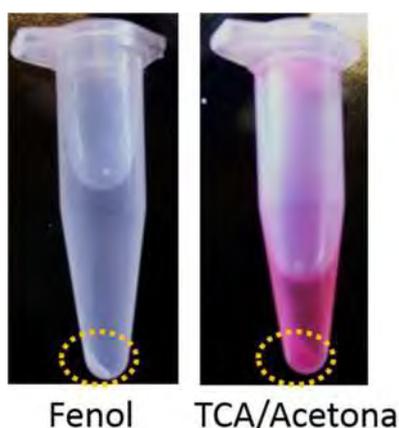


Figura 12. Diferencia obtenida de los dos protocolos de extracción.

Se muestra la diferencia de color y tamaño de la pastilla obtenida en ambos protocolos.

En el voltaje máximo del isoelectroenfóque, en ambas condiciones de extracción se alcanzaron los 6 500 V, lo cual sugiere que existe una interferencia para alcanzar los 9 000 V máximos; sin embargo, los geles de isoelectroenfóque fueron llevadas a 32 000 VT con 100 µg de proteína total. Al visualizar las imágenes obtenidas de cada condición, se observó falta de enfoque en ambos protocolos; sin embargo, con la extracción de fenol se visualizaron más manchas peptídicas que en la extracción con TCA/Acetona (Figura 13).

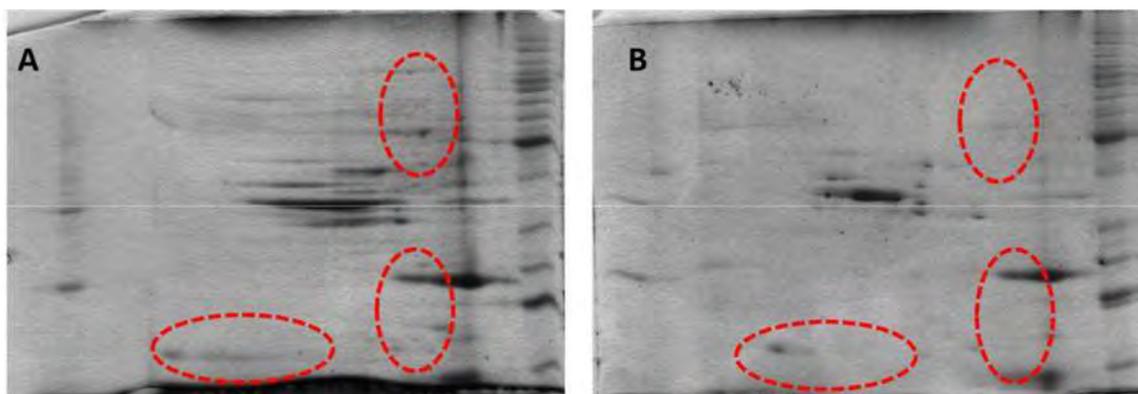


Figura 13. Electroforesis bidimensional en donde se comparan los protocolos de extracción. A) extracción con fenol. B) Extracción con TCA/Acetona. Ambos con 100 µg de muestra y corridos con 32 000 VT.

Se seleccionó el protocolo de extracción con fenol, ya que éste generó una concentración y calidad de muestra que permitieron una separación electroforética más limpia y péptidos mejor enfocada que lo obtenido con el protocolo de TCA/Acetona. Posteriormente se planteó mejorar la calidad del enfoque y alcanzar los 9 000 V máximos; también se probó un protocolo de limpieza con acetona y diferentes concentraciones de proteína. Los tres ensayos se llevaron a 50 000 VT (Figura 14).

En la Figura 14 A se observa una buena concentración de péptidos, ya que en algunos de ellos presentan baja concentración en todos los pesos moleculares. En la Figura 14 C se observó un sobre-enfoque, ya que las manchas de las imágenes se observan alargadas; también se perdieron manchas de menor abundancia de bajo y alto peso molecular, por lo que no se recomienda realizar limpieza en las muestras.

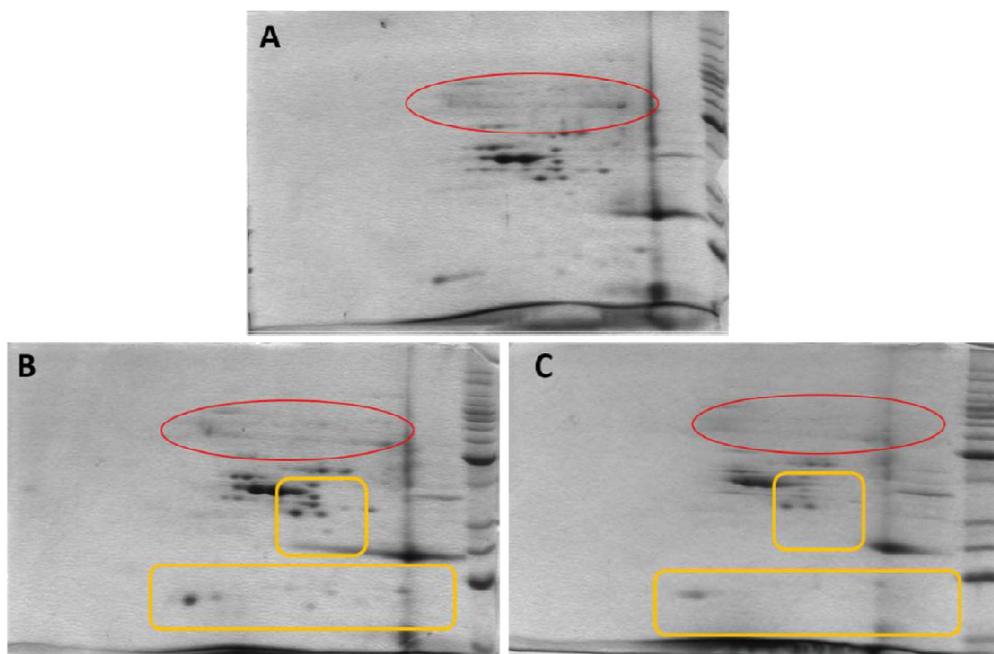


Figura. 14. Evaluación del protocolo de limpieza de extractos de zarzamora (50 000 VT). Donde A y B): 100 y 150 μg de proteínas sin limpieza, respectivamente; C): 150 μg de proteínas con limpieza.

Para estandarizar la técnica con geles IPG de 7 cm, se probaron lavados con solución de extracción de fenol para obtener una mejor limpieza en la muestra, sin llegarse a presentar dificultades por impurezas en el enfoque. También se probaron concentraciones de 80 μg para una mejor separación de los péptidos, las cuales no se muestran en imagen.

Una vez que se probaron diferentes concentraciones, se logró una visualización de proteínas de frutos de zarzamora en el extracto de proteínas totales aplicando sonicación durante 5 min. Por lo tanto, las concentraciones para geles de 7 cm fueron de 100 μg de proteína y se aplicaron de 40 000 VT (Figura. 15). En base a estos resultados, se prosigió con la estandarización de los geles de 18 cm.

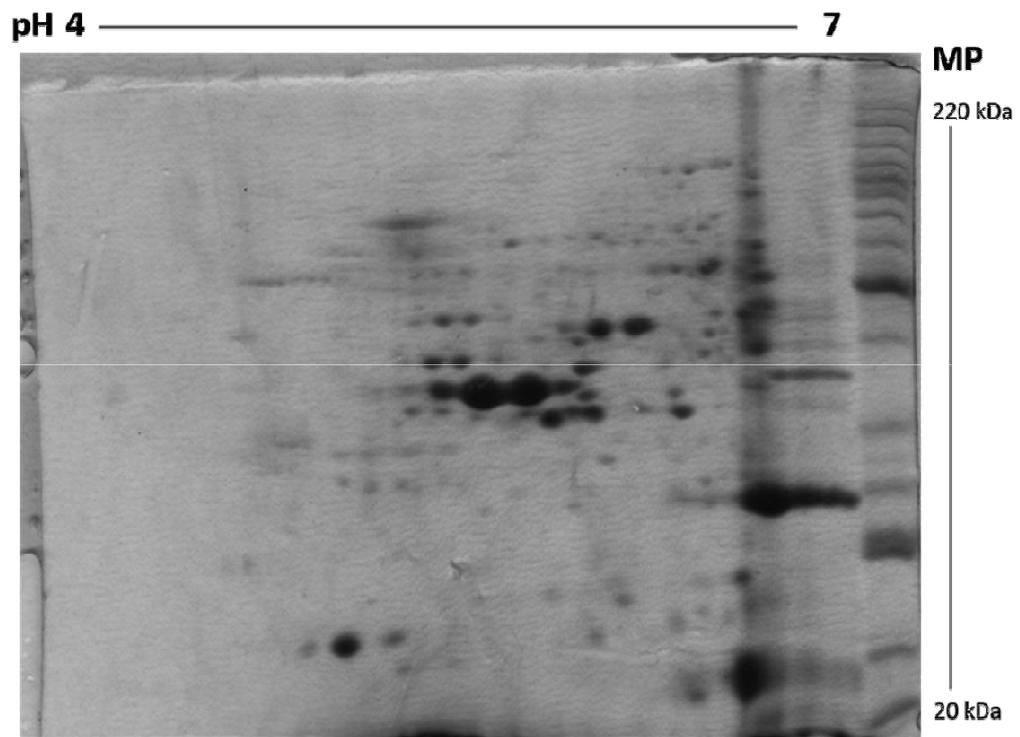


Figura 15. Condiciones finales para enfoque de geles de 7 cm. Los intervalos de pH fueron de 4 a 7, utilizando una concentración de 100 μg de proteínas y 40 000 VT.

6.4.2 Estandarización de metodología en geles de 18 cm

La separación de los péptidos de zarzamora en geles de 7 cm nos mostró que las concentraciones de urea y thiourea utilizadas en las soluciones de rehidratación durante en IEF son las adecuadas para la resolución de estos péptidos; sin embargo, no se delimitaban las manchas, debido a que el tamaño de estos geles fue de 7 cm, mientras que los péptidos en su mayoría se acumulan en el centro de los geles, por lo que se decidió utilizar geles de 18 cm y así lograr delimitar los péptidos.

Para la estandarización de la metodología para los geles de 18 cm, se inició con una variación en la concentración de proteínas y voltaje total, iniciando con 700 μg y 90 000 VT, respectivamente (Figura 16 **A**); también se visualizó un sobre-enfoque de la muestra, por lo que en el siguiente ensayo se disminuyó el voltaje a 70 000 VT (Figura 16 **B**). Al observar estos resultados, se identificó una menor cantidad de proteínas en relación a lo reportado por otros autores en geles de este tamaño. Para el siguiente ensayo se aumentó la concentración a 800 μg , con la misma cantidad de voltaje (Figura 16 **C**) y se observó que los péptidos no lograban enfocarse, sugiriendo una saturación del gel. Por último, se probaron 700 μg de proteína y 70 000 VT y se le adicionó al protocolo de extracción un lavado más con solución amortiguadora de extracción, en donde se observó una imagen más limpia (Figura 16 **D**), sin embargo, se presentaron pérdidas de péptidos de menor abundancia, por lo que se sugirió aumentar de nuevo la concentración de proteínas para tratar de mejorar la imagen de los geles y obtener un mayor número de péptidos enfocados.

Se realizaron diferentes ensayos con diferentes concentraciones de proteínas totales, que fueron desde los 500 μg a los 800 μg , y con variación del voltaje total desde los 60 000 VT a los 75 000 VT. Los mejores resultados se obtuvieron con una concentración de 700 μg y un voltaje de 70 000 VT, por lo que se probaron estas condiciones en las tres etapas de maduración (E4, E6 y E7). Al realizar estas pruebas, se observó que los patrones electroforéticos cambiaban según el estadio de maduración, por lo que se concluyó que las condiciones para cada estadio de maduración son diferentes. También se estableció que para el estadio E4 la concentración sería 550 μg con 70 000 VT, para el E6 650 μg de proteína con 73 000 VT y el estadio E7 550 μg con 70 000 VT (Figura 17).

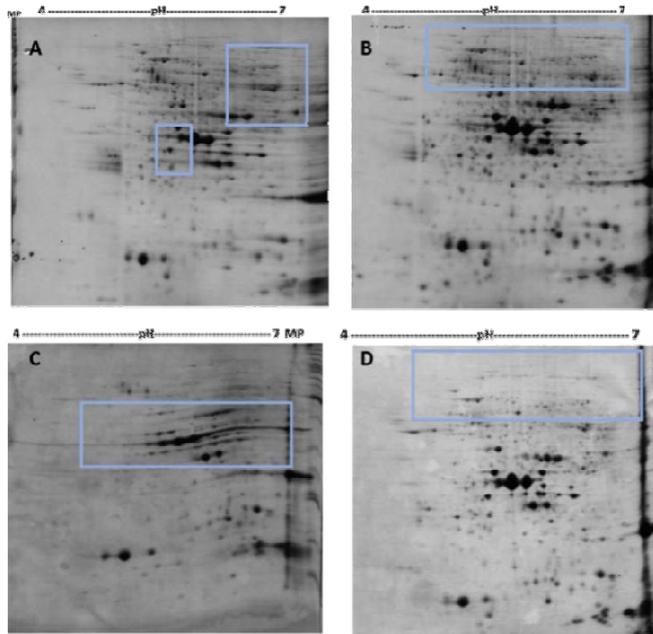


Figura 16. Ensayos de isoelectroenfoque para geles de 18 cm. A) Tiene una concentración de 700 µg con un voltaje de 90 000 VT; **B)** presenta 700 µg con 70 000 VT; **C)** tiene 800 µg y 70 000 VT y **D)** 700 µg y 70 000 VT con lavados extras en el protocolo de extracción.

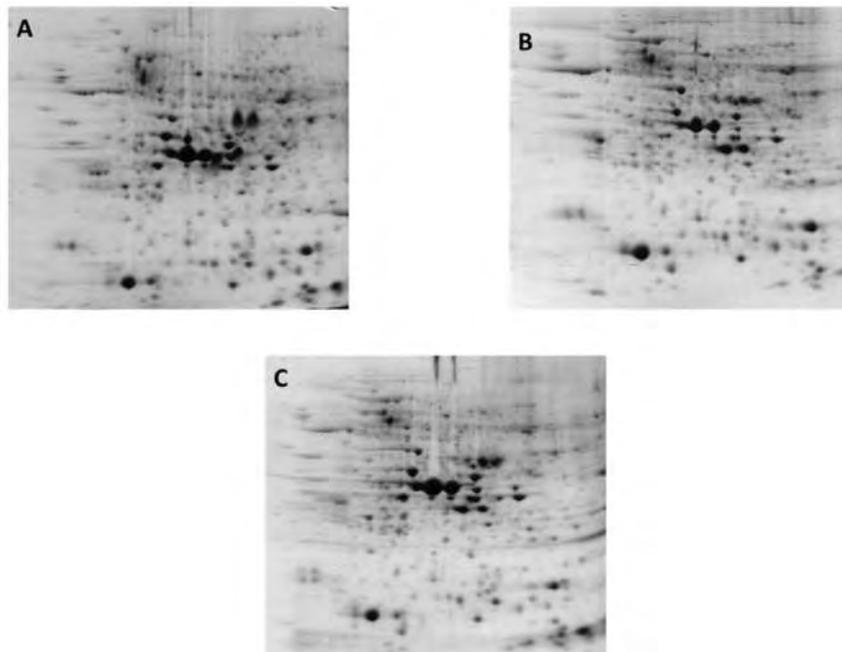


Figura 17. Condiciones de isoelectroenfoque para geles de 18 cm con frutos de zarzamora en etapas de maduración. A) Estadio E4

(concentración de 550 µg y 70 000 VT); **B**) Estadio E6 (650 µg y 73 000 VT); y **C**) Estadio E7 (550 µg y 70 000 VT).

Una vez establecidas las condiciones particulares de cada estadio, se realizaron réplicas técnicas de cada condición, obteniendo 10 réplicas de cada una de ellas, y se obtuvieron las imágenes para su análisis en el programa de cómputo.

6.4.3 Análisis de imagen

Al obtener 10 réplicas técnicas de cada estadio de maduración (E4, E6 y E7), se generó un total de 30 imágenes para analizar en el programa. Bajo las condiciones mencionadas en la metodología, se detectaron alrededor de 420 a 520 manchas (proteínas) en cada una de las 3 condiciones analizadas (Cuadro 6 y Figura 19 **A, B y C**). Se muestran las cuantificaciones de spots por estadios de maduración de las réplicas biológicas y técnicas.

Cuadro 6. Número de spots por gel de cada estadio de maduración¹.

Réplicas		Estadios de maduración		
Biológicas	Técnicas	E4	E6	E7
		No. Spots	No. Spots	No. Spots
Planta 1	R1	453	454	530
	R2	505	511	531
Planta 2	R1	508	446	526
	R2	503	471	478
Planta 3	R1	469	462	406
	R2	449	543	488
Planta 4	R1	433	418	462
	R2	481	468	449
Planta 5	R1	527	576	463
	R2	539	531	447
PROMEDIO		486.7	488	478

¹ Se muestran las cuantificaciones de spots por estadios de maduración de las réplicas biológicas y técnicas

6.4.3.1 Sobreposición de los geles

En la sobreposición de los 29 geles respecto al gel de referencia, se observaron varias inconsistencias en el “match” y se identificó que los geles provenientes de la

planta P1, en cualquiera de los estadios, generaban alteraciones sobre los demás geles, por lo que se eliminaron todos los geles de esta planta y se supuso que las muestras biológicas provenientes de ésta fueron afectadas por algún efecto diferente a la maduración.

Con este cambio se analizaron 24 geles en total, en donde se realizó la sobreposición de las imágenes de estos geles para realizar el “matcheo” general. En primera instancia se obtuvieron 802 *matches* totales. Con el objetivo de eliminar artefactos o alteraciones en las imágenes que pudieran generar falsos *matches*, se observaron de manera individual y detalladamente los 802 *matches* en todas las imágenes obtenidas.

Una vez analizado cada *match* de forma individual, se obtuvieron 617 *matches*, de los cuales se seleccionaron los que estuvieran presentes en al menos el 80% de los geles (18 geles). Terminada la selección de *matches*, se obtuvieron como resultado 258 *matches* en total, de los cuales 143 estaban presentes en los 24 geles y correspondieron a más del 55 % del total de *matches*.



Figura 18-A. Imágenes de las réplicas técnicas y detección de spots del estadio E4. Se utilizó el programa Melanie 7.0 para la identificación de spots y la estimación de punto isoeléctrico y masa molecular.





Figura 18-C. Imágenes de las réplicas técnicas y detección de spots del estado E7. Se utilizó el programa Melanie 7.0 para la identificación de spots y la estimación de punto isoeléctrico y masa molecular.

6.4.4 Análisis de componentes principales

Se obtuvieron los valores normalizados de la abundancia de cada mancha de los 258 *matches* que pasaron los filtros de selección; éstos se analizaron estadísticamente para conocer el cambio de la abundancia.

El 100 % de la varianza de los datos se redujo a un total de 11 PCs de los cuales los primeros dos explican el 26 % de la variación, lo cual es suficiente para separar los tres estadios de maduración (Figura 19). El primer componente separa al estadio E6 y E7 y el segundo componente separa al E4.

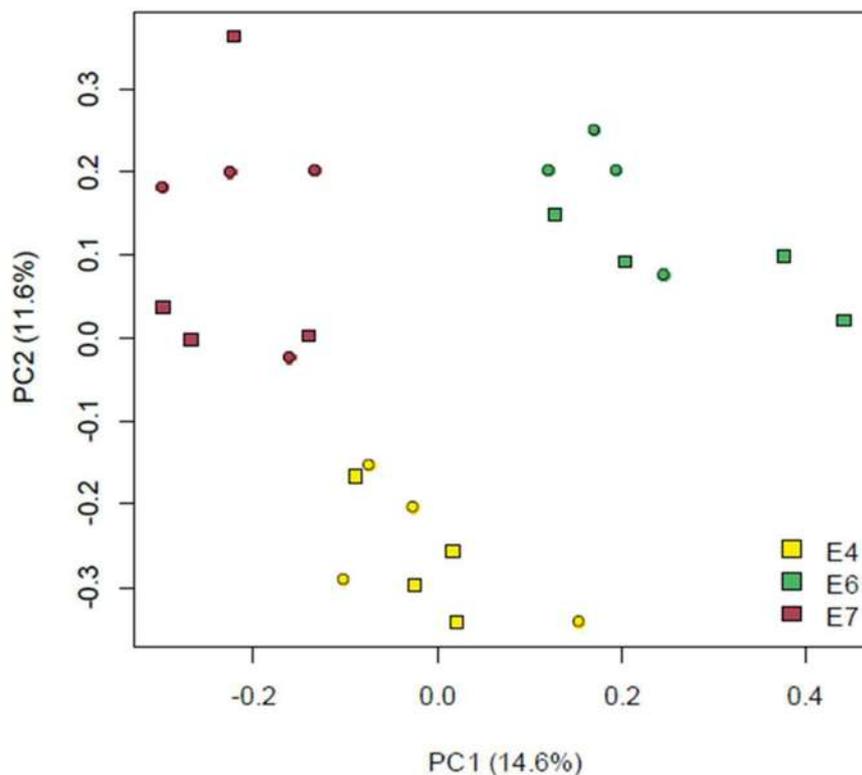


Figura 19. Estructura de los datos basados en la comparación de los componentes 1 y 2. Se muestra la separación de los estadios de maduración, amarillo E4, verde E6 y rojo E7, representando con figura cuadrada las réplicas 1 y círculo las réplicas 2.

Para la selección de proteínas diferenciales, se determinó la importancia de cada *match* en la separación de los estadios de maduración; esto se realizó con base en la traza de vectores de separación de los estadios de maduración (Figura 20 A) y vectores unitarios de cada *match* (Figura 20 B). Así, a cada *match* se le asignó un valor proporcional a la proyección de vectores, dando como resultado una determinación numérica a la importancia de cada *match* (Figura 20).

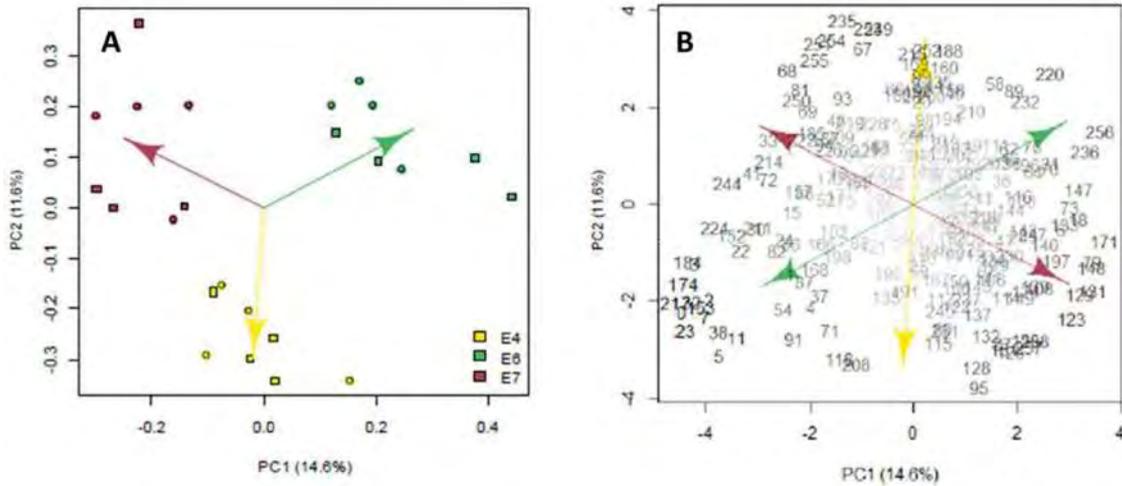


Figura 20. Traza de vectores de separación. En donde A muestra los vectores de separación entre estadios y B muestra los vectores unitarios de cada *match*; en B se observa el número de ID de cada *match* presente en los dos primeros componentes.

Una vez que se asignó el valor de cada *match*, se pasó a la selección de *match* diferenciales, en donde éstos se ordenaron jerárquicamente en respuesta a la maduración de frutos de zarzamora. Los resultados mostraron que 45 *matches* (4 compartidos en estadios) contribuyeron significativamente ya sea en el componente 1 ó en el 2.

En base al análisis de agrupación jerárquica de los estadios y geles realizados y el valor de cada *match*, se realizaron los “heatmaps”, en donde se representa la abundancia relativa y la significancia de las manchas de cada gel en los primeros dos componentes; estos “heatmaps” tuvieron como objetivo visualizar un panorama general de los efectos observados en el análisis (Figura 21). Al analizar esta figura se resaltan los *match* de mayor y menor abundancia, así como un patrón de *matches* que no presentan significancia en diferentes estadios (*match* en azul) pero si presentan significancia en otros estadios (*match* en rojo).

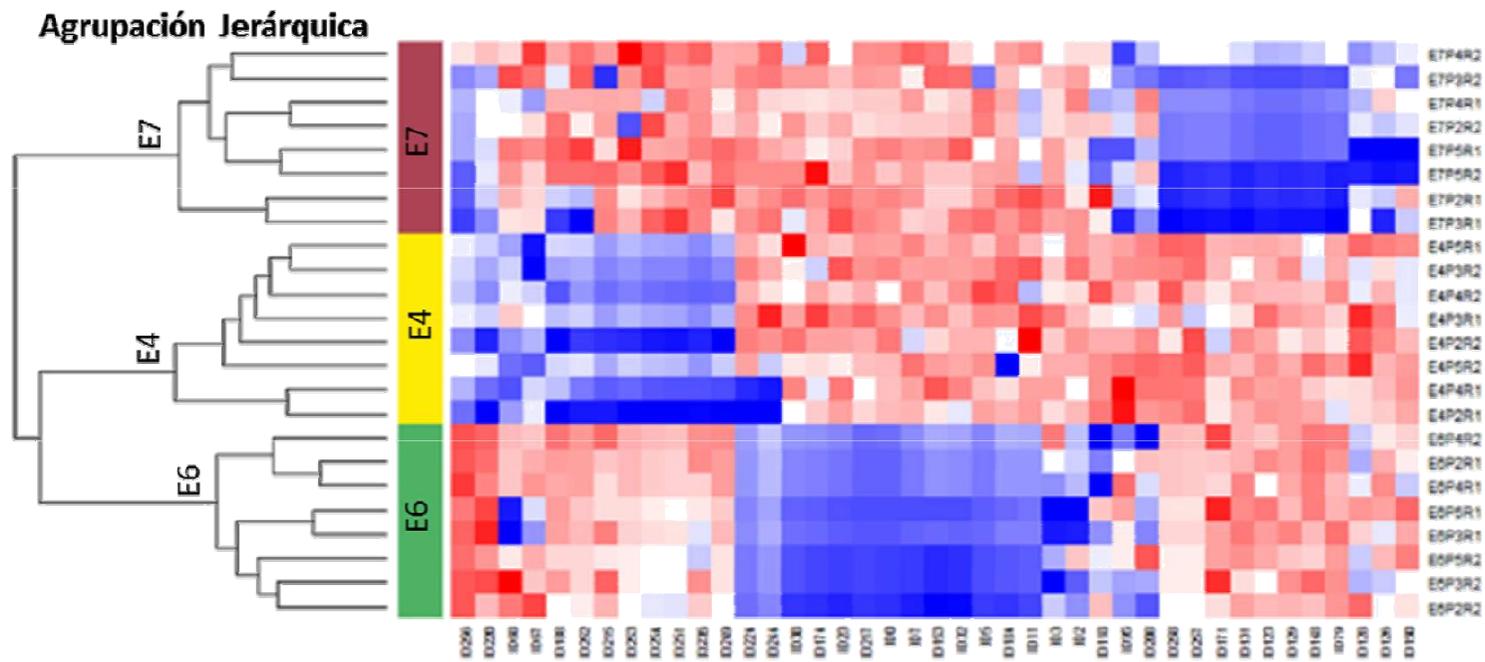
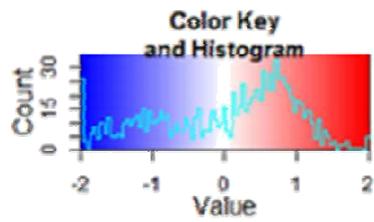


Figura 21. Agrupación jerárquica de los *MATCHES* que se observan durante la maduración de frutos de zarzamora. El heatmap está organizado jerárquicamente para los *matches* (columnas) y por gel (filas). Cada cuadro del heatmap indica el área de un spot en un gel, la cual es relativa a la media de las áreas de ese mismo spot, los tonos azules indica spots menores que la media y rojos spots mayor intensidad

Para comparar los resultados obtenidos de la selección de *match* de mayor importancia se realizó el análisis estadístico de ANOVA en donde se observó que, debido a que el análisis de ANOVA toma los resultados significativos se sobrerrepresentaba el estadio E6 y se encontraron 61 *match* significativos; en donde 38 *match* fueron observados en el PCAs (Fig. 22). Este análisis al ser univariado se pierde información, debido a que estipula que los spots que no fueron detectados se deben a las variaciones técnicas y no biológicas, minimizando estos últimos cambios.

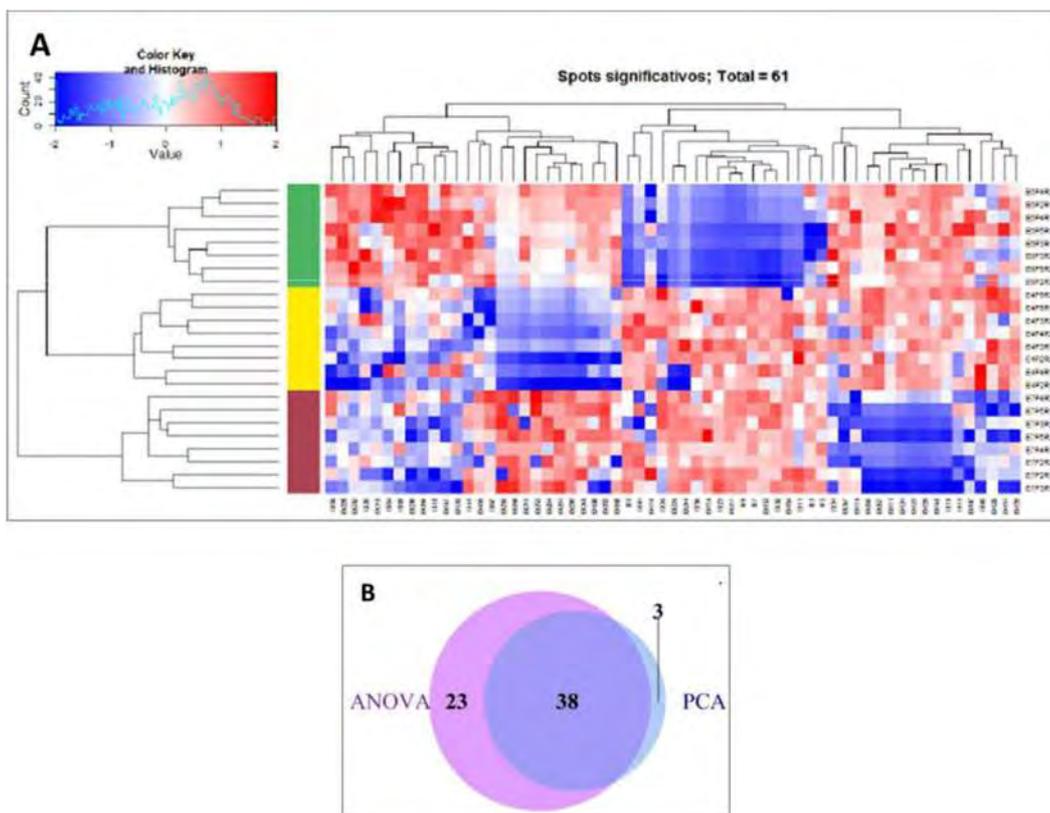


Figura 22. Agrupación jerárquica de los MATCHES en base al ANOVA. En donde **A** muestra el heatmap de los 61 *match* ordenados jerárquicamente. **B** indica la comparación del PCAs vs ANOVA en la selección de los *match* de mayor importancia en la maduración de los frutos de zarzamora.

I. DISCUSIÓN

7.1 Análisis Físicoquímicos.

El desarrollo de los frutos es un proceso bioquímico complejo en donde se incluyen diferentes etapas. En una primera etapa resaltan la división y alargamiento celular que da como resultado el aumento de talla de los frutos, mientras que en una segunda etapa se lleva a cabo la maduración de los frutos, durante esta etapa intervienen cambios metabólicos importantes como la variación del contenido de azúcares y ácidos entre otros (Manning 1996). La identificación de etapas o estadios del desarrollo de los frutos es un punto importante para iniciar cualquier investigación que se realice, en la zarzamora se han reportado muy pocas escalas del desarrollo y el número de estadios es variable entre 5 y 9, pero dentro de los parámetros que separan a estas etapas la coloración de las drupelas de los frutos es un indicador indiscutible (Berg, 2008). Al seleccionar en nuestra escala 8 estadios de maduración encontramos que algunas de estas etapas fueron seleccionadas en otras investigaciones como la etapa E1 E5 y E8 que son de referencia, debido a que se identifican con facilidad. Chávez-Franco (2000) evalúa las propiedades biomecánicas de frutos de zarzamora y describe 5 etapas del desarrollo de los frutos (M1 a M5) utiliza porcentajes de coloración de drupelas para separar sus estados de desarrollo, diferente a los reportado por Chávez-Franco (2000) y Esquivel en el 2008 reporta que utilizó en su investigación 9 etapas de desarrollo de los frutos para evaluar sus propiedades físicoquímicas, sin embargo esta última escala únicamente muestra una imagen en donde se encuentran los estadios que utilizaron para su experimento, con lo que genera confusión entre los estadio.

En nuestro grupo de trabajo se ha generado una escala de maduración en el 2013 en donde se publicó 6 estadios de desarrollo de frutos de zarzamora (Chavez-Barcenas *et al.*, 2013) sin embargo en la presente investigación se observó que dicha escala no incluía estadios que en la actualidad son requeridos en las cosechas para los empaques de la región por lo que en la escala que obtuvimos donde consideramos etapas de coloración marrón y negro opacas, también consideramos el peso y talla de los frutos. Se observó que el mayor peso de los frutos se encontraba en el E8 y que en cada estadio de desarrollo el peso aumentaba de manera significativa.

Los parámetros físicoquímicos que se tomaron en cuenta para la descripción de cada etapa del desarrollo de los frutos se han reportado en diversos frutales, como, plátano (Casallas Malaver, 2010) manzana (Alonso Gaité 2011), fresa (Casierra-Pesada, 2011), arandano (Zapata 2010) y zarzamora (Esquivel, 2008) en donde se reporta el contenido de sólidos solubles totales, acidez total titulable, y pH.

En zarzamora se ha reportado que en frutos de maduración óptima de consumo el pH varía de 3.0 a 3.4 (Esquivel 2008; García 2011) lo cual es comparable con los resultados obtenidos en nuestro análisis (E7 3.2 pH) sin embargo en los primeros estadios de desarrollo se observaron diferencias con lo reportado anteriormente debido a que Esquivel reporta que el estadio con mayor contenido de ácido es el 1 mientras que en nuestros resultados el estadio E3 fue el más ácido, esto puede ser debido a que no queda claro que tamaño tiene el fruto en la etapa 1 descrita por Esquivel y que se pudiera estar tratando del mismo tamaño de fruto.

Con respecto al contenido de azúcares totales en los frutos (SST) se observan reportes de aumento de concentración de los SST al inicio de la etapa 4 según Esquivel lo cual es totalmente de acuerdo con lo encontrado en nuestra investigación en donde también se observa como el inicio del aumento de la concentración en el E4. En diferentes reportes se muestra que el incremento de los sólidos solubles totales inicia una vez que baja la concentración de ácidos (Casallas Malaver, 2010).

El presente proyecto se evaluaron las características de calidad más utilizadas en la caracterización de frutos de diferentes especies, sin embargo aunque existen diversos trabajos utilizando zarzamora como modelo de estudios estos evalúan los frutos en las últimas etapas del desarrollo o maduración (Martínez-Cruz *et al.*, 2011; Perkins-Veazie *et al.*, 1992; Perkins-Veazie *et al.*, 2000), cabe resaltar que la evaluación realizada en nuestro proyecto donde se tomó en cuenta etapas que incluyen frutos de un peso de 1.2 g hasta 10.1 g se trató de considerar un amplio rango de etapas de los frutos de zarzamora únicamente es comparable con lo reportado por Esquivel en el 2008 donde reporta ocho etapas que describe el contenido de ácidos totales, SST, ceniza y humedad.

Por lo que nuestros resultados aportan una amplia información sobre los cambios fisicoquímicos que ocurren durante el desarrollo de los frutos. Además de establecer que el inicio de la maduración en los frutos de zarzamora comienza en la etapa E4 debido a los cambios en la ATT y de SST, en donde en el primer parámetro se reporta un cambio brusco del estadio E3 (16.5 % Ác. Cítrico) al E4 (4.0 % Ác. Cítrico) y en el segundo parámetro en E3 se reportó 4.8 °Brix el contenido más bajo y el E4 5.9 °Brix. Las etapas de maduración de los frutos fueron E4, E5, E6 y E7 debido a que presentan aumentos en el contenido de azúcares totales (& a 8 °Brix), el pH y la ATT se mantienen sin cambios significativos.

El estadio que representa la sobre maduración es el E8 debido a que es el estadio menos firme con 0.07 N de fuerza requerida para su penetración, en el 2000 Chávez-Franco reporta un análisis de firmeza en frutos de zarzamora en donde compara la firmeza de 5 etapas de desarrollo de los frutos y hace mención a que la etapa M1 (50 % verde) se requiere una fuerza de 2.37 kg de fuerza para deformar, el M2 (60 % rojo)

0.368 kg, el M3 (90 % rojo) 0.320 kg, el M4 (90 % negro) 0.287 kg y el M5 (98 % negro) 0.248 kg, estos resultados indican la disminución de fuerza que se requiere mientras que la maduración avanza. Estos reportes apoyan nuestros resultados que indican que la etapa de mayor firmeza es el E1 donde fue necesaria una fuerza de 1.52 kg, sin embargo en nuestro resultado el E3 es el estadio en donde se requirió más fuerza para la penetración (2.04 kg) teniendo este estadio en nuestra escala una coloración verde-amarillo y de un tamaño en promedio de 4.16 g.

7.2 Proteómicos

El primer paso para analizar el proteoma de cualquier tejido vegetal es encontrar un protocolo de extracción de proteínas, debido a que la cantidad y calidad de las proteínas solubilizadas depende de la pureza del extracto (Stasyk *et al.*, 2001). La preparación de la muestra tiene como finalidad de visualizar un mayor número de proteínas contenida en los tejidos de estudio (Flengsrud y Kobro, 1989, Stasyk *et al.*, 2001) Los tejidos vegetales a menudo representan un material de partida complicado para la extracción de proteínas y su estudio mediante electroforesis bidimensional. Además, los tejidos vegetales son ricos en compuestos que producen interferencias y pérdida de reproducibilidad (contenido en sales, ácidos orgánicos, fenoles, proteasas endógenas, ligninas, pigmentos, terpenos, ceras..., que se acumulan en diferentes compartimentos y orgánulos que ocupan gran parte del volumen celular). Por todas estas razones, un buen método de extracción de proteínas de los tejidos vegetales debe contemplar la eliminación de compuestos de naturaleza no proteica, la disociación completa de las interacciones entre diferentes proteínas y la inhibición de las proteasas. En estudios de proteómica de frutos suaves como es el caso de la zarzamora, se han probado diversos protocolos de extracción; sin embargo en el 2006 Issacson propone dos protocolos de extracción de proteínas totales; un protocolo en donde utiliza fenol saturado con Tris-HCL a un pH de 8 y otro donde se extrae el proteoma con TCA. Ambos protocolos son utilizados para frutos como tuna (Rosas-Cárdenas, 2008), uva (Sharathchandra, 2011), durazno (DAmbrosio, 2013), tomate (Casado Vela, 2006), papaya (Beserra, 2012), entre otros.

En los frutos de zarzamora se tienen grandes concentraciones de compuestos fenólicos para la eliminación de estos compuestos se utilizó el protocolo de Rosas. Que en el año 2008 se probaron tres protocolos de extracción (TCA, fenol y acetona) de proteínas en frutos de tuna y observó que el protocolo de extracción con fenol es el de mejores resultados debido a que obtiene la más alta concentración de proteínas totales y mejor isoelectroenfoco en los geles 2DE. En frutos como la uva el protocolo de extracción con TCA ha dado buenos resultados, debido a que elimina agentes poliméricos del extracto y muestra una buena solubilización de la muestra

(Sharathchandra *et al.*, 2011; Fraige *et al.*, 2015). Es por esto que se probaron ambos protocolos en zarzamora. En el 2012 nuestro grupo de trabajo realizó un primer acercamiento en la extracción de proteínas totales de zarzamora con acetona como agente extractor, sin embargo la concentración de proteína fue de 4.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y los patrones electroforéticos se observan con sombras los que demuestra que el extracto de proteínas se encontraba contaminado. En busca de mejoras en el protocolo de extracción de proteínas se obtuvo que el protocolo de fenol descrito por Isaacson (2006) muestra concentraciones mayores de proteínas que el utilizado anteriormente (7.9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y patrones electroforéticos uniformes y disminuyendo considerablemente la contaminación, estas concentraciones son superiores al valor mínimo requerido para análisis de proteomas (Görg *et al.*, 2004).

La estandarización de la técnica de isoelectroenfoque es otro paso crucial debido a que se prueban las condiciones para obtener geles 2DE con buena resolución y la mayor cantidad de péptidos enfocados (Stasyk *et al.*, 2001). Al analizar las características de cada estadio de maduración de zarzamora, encontramos que cada una presentaba diversas particularidades, esto se debe a la naturaleza misma de las muestras, su consistencia, el contenido de fenoles, tamaño de los frutos entre otras. Debido a que cada etapa de maduración es contrastante a otra se estableció que las mejores concentraciones de proteína total se encontraban en un rango de los 500 μg a los 600 μg , en geles de 18 cm. Al comparar esta concentración con otros reportes, observamos que se encontraba fuera de los rangos utilizados por diversos autores; ya que en durazno se utilizaron 300 μg para geles de 17 cm y obtuvieron patrones electroforéticos con buena resolución (DAmbrosio, 2012) y en uva Fraige en el 2015 y su grupo de trabajo utilizaron 400 μg para geles del mismo tamaño; aunque es debido mencionar que esta resolución también se ve afectada por el protocolo de tinción el cual se mostraba diferente en ambos trabajos al utilizado en este ensayo.

La concentración de proteínas totales que fue utilizada en tuna fue de 750 μg en geles de 17 cm y fue suficiente para obtener perfiles de buena resolución y una cantidad de manchas de 800 a 1 000 spots, esta cantidad de spots observados en tuna (Rosas-Cárdenas, 2008) es el doble de los observados en zarzamora de este ensayo y puede deberse a el alto contenido de fenoles en zarzamora que pueden afectar el isoelectroenfoque. También se observó que los rangos de pI de 5.0 a 6.5 y de 15 a 100 kDa se encontraba el mayor número de proteínas, patrón similar a lo reportado en otros frutos como en uva (Sarry *et al.*, 2004) y tomate (Faurobert *et al.*, 2007), los cuales concentran el mayor número de proteínas en un rango de PM de 50-100 kDa y un pI de 5.5 a 6.6.

El análisis proteómico fue aplicado para monitorear los cambios en el perfil proteínico durante la maduración de zarzamora con maduración contrastante (Görg *et al.*, 2004).

Este estudio se basó en la separación de las proteínas en 2-DE, el cual resolvió cientos de proteínas en los rangos de pH de 4 a 7 y PM de 10 a 220 kDa, las cuales fueron analizadas con el programa computacional Melanie ver. 7.0 y se obtuvo una compleja base de datos. Los CP sintetizan la información en base a la reducción de número de variables perdiendo la menor información y generando nuevas variables (componentes principales) (Valledor, Jorrín, 2011). Los resultados de los CP permitió la comparación de los tres estadios de maduración y se observó que en los primeros dos componentes se explicó el 26 % de toda la variación, en este sentido estudios como en arabisopsis han reportado que en los primeros tres componentes se encuentra representado el 54.4 % de la varianza total (Alonso 2014).

VIII. CONCLUSIONES

Durante la maduración de los frutos de zarzamora se presentan ocho etapas, que incluyen cambios en el tamaño, color y peso de los frutos.

El desarrollo de los frutos de zarzamora comprende dos etapas, una de crecimiento que está caracterizada por el aumento de peso y tamaño de los frutos y la segunda que presenta la maduración, en donde se distinguen los aumentos de azúcares, la disminución de la firmeza y el cambio de coloración de los frutos.

Las condiciones establecidas para la obtención de patrones proteicos en la electroforesis 2-DE en geles de 18 cm, permiten comparar el contenido del proteoma de tres estadios de maduración contrastante de frutos de zarzamora.

Se logró seleccionar manchas significativas para la maduración de frutos de zarzamora, utilizando un análisis multivariado (PCAs) y una agrupación jerárquica.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Aharoni A., Keizer L. C. P., Van Den Broeck H. C., Blanco-Portales R., Muñoz Blanco J., Bois G., Smit P., De Vos R. C. H. and O'Connell A. P.; 2002. Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and -independent gene expression programs in strawberry, a non-climateric fruit. *Plant Physiology*. 129: 1019-1031
- Alba R., Payton P., Fei Z. J., McQuinn R., Debbie P. and Martin G. B.; 2005. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *The Plant Cell* 17: 2954-2965.
- Alonso M. 2011. Caracterización sensorial y físico-química de manzanas reineta y pera conferencia, figuras de calidad en castilla y león. Tesis de Doctorado. Facultad de Veterinaria, Universidad de León. León, España.
- Alonso N. A. L. 2014. Cambios en el proteoma de raíz de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a capsicina. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias 66 pp.
- AOAC. 1996. Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 16th edition. Gaithersburg, M.D.
- AOAC. 2000. Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 17th edition. Gaithersburg, M.D.
- Asif M. H. and Nath P. 2005. Expression of multiple forms of polygalacturonase gene during ripening in banana fruit. *Postharvest Biology and Technology* 43: 177-184.
- Augé R. M. 2001. Water relations, drought and VA mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42.

- Bagyaraj D. J. and Sreeramulu K. R. 1982. Preinoculation with VA mycorrhiza improves growth and yield of chilli transplanted in the field and saves phosphatic fertilizer. *Plant and Soil* 69: 375-381.
- Berg L., 2008. *Plants, People and the Environment* (2^d Edition). Thomson Brooks/Cole Editors. 648 p.
- Berkelman T. and Stenstedt T. 1998. *2-D Electrophoresis using immobilized pH Gradients: Principles and Methods*. Amersham Pharmacia Biotech Ltd. Uppsala.
- Beserra Nogueiraa S., Labateb C. A., Gozzoc F. C., Pilauc E. J., Lajolo F. M. and Oliveira do Nascimento J. R. 2012. Proteomic analysis of papaya fruit ripening using 2DE-DIGE. *Journal of Proteomics* 75: 1428-1439.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brady C. J. 1987. Fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology* 38: 155-178.
- Burbidge A., Grieve T. M., Jackson A., Thompson A., McCarty D. R. and Taylor I. B., 1999. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize Vp14. *Plant Journal* 17: 427-431.
- Calderón-Zavala G. 2006. Producción forzada de Zarcamora en Mexico. III Simpósio Nacional do Morango. II Encontro Sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul Palestras 67-78.
- Cánovas M. F., Dumas-Gaudot E., Recorbet G., Jorin J., Mock H. P. and Rossignol M., 2004. Plant proteome analysis. *Proteomics* 4: 285-298.
- Carrari F. and Fernie A. R. 2006. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany* 57: 1883-1897.

- Casado-Vela J., Sellés S. and Martínez R. B. 2006. Proteomic analysis of tobacco mosaic virus-infected tomato (*Lycopersicon esculentum* M.) fruits and detection of viral coat protein. *Proteomics* 6: 196-206.
- Casallas Malaver L. F. 2010. Evaluación del análisis fisicoquímico del banano común (*Musa sapientum* L.) transformado por acción de la levadura *Candida guilliermondii*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Pontificia, Universidad Javeriana Bogota, D.C.
- Casierra-Posada F. y Gómez G. N. E. 2008. Crecimiento foliar y radical en plantas de fique (*Furcraea castilla* y *F. macrophylla*) bajo estrés por encharcamiento. *Agronomía Colombiana* 26: 381-388.
- Causier B. and Davies B. 2002. Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Molecular Biology* 50: 855–870.
- Chávez-Bárcenas A. T., Alonso-Ojeda C. y García-Saucedo P. 2012. Proteómica de la maduración de frutos de zarzamora (*Rubus* sp.) cultivados en México, una primera aproximación. *Ra Ximhai* 143-157.
- Chávez Franco S. H., Vázquez García E. y Saucedo Veloz C. 2000. Propiedades biomecánicas de frutos de zarzamora. *Agrociencia* 34: 329-335.
- Clark J. R. and Finn C. E. 2002. Tupi, a thorny large-fruited erect blackberry. *HortScience* 37: 251.
- Corzo J. 1995. Guía de producción y manejo de postcosecha mercadeo. Gremial de exportadores de productos no tradicionales. Guatemala 38.
- D'Ambrosio C., Arena S., Rocco M., Verrillo F., Novi G., Viscosi V. Marra M. y Scaloni A. 2013. Proteomic analysis of apricot fruit during ripening. *Journal of Proteomics* 78: 39-57.
- Da Silva F. G., Iandolino A., Al-Kayal F., Bohlmann M. C., Cushman M. A. and Lim H. 2005. Characterizing the grape transcriptome: analysis

- of expressed sequence tags from multiple *Vitis* species and development of a compendium of gene expression during berry development. *Plant Physiology* 139: 574-597.
- Duffy E. M. and Cassells A. C. 2000. The effect of inoculation of potato (*Solanum tuberosum* L.) microplants with arbuscular mycorrhizal fungi on tuber yield and tuber size distribution. *Applied Soil Ecology* 15: 137-144.
- Espinoza N. N. 2009. Zarcamora: Ecología y control. INIA Tierra Adentro. 50-52 pp.
- Fray R. G. and Grierson D. 1993. Molecular genetics of tomato fruit ripening. *Trends Genet* 9: 438-43.
- Fei Z. J., Tang X., Alba R. M., White J. A., Ronning C. M. and Martin G. B. 2004. Comprehensive EST analysis of tomato and comparative genomics of fruit ripening. *Plant Journal* 40: 47-59.
- Franco G. y Giraldo M. J. 2000. El cultivo de la mora. Corpoica. Manizales. 74 p.
- Giovannoni J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 725-749.
- Giovannoni J. J. and Rakshy S. 2005. Genetic regulation of tomato fruit ripening and development and implementation of associated genomics tools. *Acta Horticulturae* 682: 63-72.
- Goldschmidt E. E. 1997. Ripening of citrus and other non-climacteric fruits: a role for ethylene. *Acta Horticulturae* 463: 335-340.
- Görg, A., Weiss W. and Dunn M. J. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4: 3665-3668.

- Graham J. and McNicol R. J. 1995. An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 1128-1132.
- Grierson D. and Schuch W. 1993. Control of Ripening. *Transactions of the Royal Society of London, Series B* 342: 241-250.
- Grierson D., Tucker G. A. and Robertson N. G. 1981. The molecular biology of ripening. *Biochemistry of Fruit and Vegetables* 179–191.
- Grierson, D., and Tucker, G. (1983). Timing of ethylene and polygalacturonase synthesis in relation to the control of tomato fruit ripening. *Planta* 157: 174–179.
- Grimplet J., Romieu C., Audergon J. M., Marty I., Albagnac G. and Lambert P. 2005. Transcriptomic study of apricot fruit (*Prunus armenica*) ripening among 13,006 expressed sequence tags. *Physiologia Plantarum* 125: 281-292.
- Hennig L., Grisse W., Grossniklaus U. and Kohler C. 2004. Transcriptional programs of early reproductive stages in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2004. 135:1765-1775.
- Hernández-Díaz M. I. y Chailloux-Laffita M. 2001. La nutrición mineral y la biofertilización en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Temas de Ciencia y Tecnología* 5:11-27.
- Holcroft, D. M. and Kader A. A. 1999. Controlled atmosphere-induced changes in pH and organic acid metabolism may affect color of stored strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 17: 19-32.
- Isaacson T., Damasceno M. B. C., Saravanan R. S., He Y., Catalá C., Saladié M. and Rose J. K. C. 2006. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nature Protocols* 1: 769-774.

- Jennings D. L. 1988. Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth. Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, UK. 230 p.
- Kader A. A. 1986. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technology* 40: 99-104.
- Katz E., Martinez Lagunes P. and Riov J. 2004. Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric Citrus fruit. *Plant* 219: 243–52.
- Katz E., Fon M., Eigenheer R. A., Phinney B. S., Fass J. N. and Lin D. W. 2010. A label-free differential quantitative mass spectrometry method for the characterization and identification of protein changes during citrus fruit development. *Proteome Science* 8: 68(19 p.).
- Kaya C., Higgs D., Kirnak H., Tas I. 2003. Mycorrhizal colonization improves fruit yield and water use efficiency in watermelon (*Citullus lanatus* Thunb.) grown under well-watered and water stressed conditions. *Plant and Soil* 253: 287-292.
- Kazt E., Fon M., Lee Y. J., Phinney B. S., Sadka A. and Blumwald E. 2007. The citrus fruit proteome: insights into the citrus fruit metabolism. *Planta* 226: 989–1005.
- Kok E. J., Lehesranta S. J., van Dijk J. P., Helsdingen J. R., Dijksma W. T. P. and Van Hoef A. M. A. 2008. Changes in gene and protein expression during tomato ripening. Consequences for the safety. *Food Science and Technology International* 14: 503–518.
- Kumar A. and Ellis B. E., 2001. The Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene Family in Raspberry. Structure, Expression, and Evolution. *Plant Physiology* 127 230-239.
- Laemmli V. K. 1970. Denaturing (SDS) discontinuous gel electrophoresis *Nature* 227: 680-685.

- Lara I. and Vendrell M. 2000. Changes in abscisic acid Levels, ethylene biosynthesis, and protein patterns during fruit maturation of 'Granny Smith' apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125: 183-189.
- Lelievre J. M., Latche A., Jones B., Bouzayen M. and Peach J. C. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum* 101: 727-739.
- Lemaire-Chamley M., Petit J., García V., Just D., Baldet P., and Germain V. 2005. Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiology* 139: 750-769.
- Liu K., Yuan C., Li H., Lin W., Yang Y., Shen C. and Zheng X. 2015. Genome-wide identification and characterization of auxin response factor (ARF) family genes related to flower and fruit development in papaya (*Carica papaya* L.). *BMC Genomics* 16: 901.
- Lizada C. 1993. Mango. pp 255-271. In: Seymour G. B., Taylor J. E. and Tucker G. A. (eds). *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman & Hall. London
- Manning K. 1996. Soft fruit. pp. 347-378. In: Seymour G. B., Taylor J. E. and Tucker G. A. (eds). *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman & Hall. London
- Manning, K. 1998. Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta* 205: 622–631.
- Martínez-Cruz N. S., Arévalo-Niño K., Verde-Star M., Rivas-Morales C., Oranday-Cárdenas A., Núñez-González M. A. y Morales-Rubio M. E. 2011. Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (zarzamora). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 42: 66-71.
- Moore J. N. and Skirvin R. M. 1990. Blackberry management. p. 214-244. In: Galletta G. J. and Himelrick D. J. (eds.). *Small Fruit Crop Management*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.

- Moyle R., Fairbairn D. J., Ripi J., Crowe M., and Botella J. R. 2005. Developing pineapple fruit has a small transcriptome dominated by metallothionein. *Journal of Experimental Botany* 56:101–12.
- Muccilli V., Licciardello C., Fontaninic D., Russo M. P., Cunsola V., and Saletti R. 2009. Proteome analysis of *Citrus sinensis* L. (Osbeck) flesh at ripening time. *Journal of Proteomics* 73:134–52.
- Nybom H. and Kraft T., 1995. Applications of DNA fingerprinting of the taxonomy of European blackberry species. *Electroforesis* 16: 1731-1735.
- Nilo R., Saffie C., Lilley K., Baeza-Yates R., Cambiazo V. and Campos-Vargas R. 2010. Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE). *BMC Genomics* 11: 43.
- Ochoa F. 2008. La zarzamora ante los retos de la globalización y el desarrollo local: el caso del municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, México. Tesis de M. C. en Desarrollo Rural Regional Universidad Autónoma Chapingo. 194 p.
- O'Farrell P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 250: 4007-4021.
- Pan Z. Y., Liu Q., Yun Z., Guan R., Zheng W. F. and Xu Q. 2009. Comparative proteomics of a lycopene-accumulating mutant reveals the important role of oxidative stress on carotenogenesis in sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] osbeck). *Proteomics* 9: 5455-5470.
- Perkins-Veazie P., Clarck J. R., Huber D. J. and Baldwin E. A. 2000. Ripening physiology in "Navaho" thornless blackberries: color, respiration, ethylene production, softening and composition changes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125: 357-363.

- Perkins-Veazie P., Collins J. K. and Clark J. R. 1996. Cultivar and maturity affect postharvest quality of fruit from erect blackberries. *HortScience* 31: 258-261.
- Perkins-Veazie P. and Nonnecke G. 1992. Physiological changes during ripening of raspberry fruits. *HortScience* 27: 331- 333.
- Piña-Dumoulin G., Saucedo V. V. C., Ayala E. V. y Muratalla L. A. 2001. Atmósferas controladas para combatir daños postcosecha en zarzamora (*Rubus* sp.). *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 18: 87-105.
- Porata R., Weissa B., Cohena L., Dausa A., Gorenb R. and Drobya S. 1999. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of 'Shamouti' oranges. *Postharvest Biology and Technology* 15: 155-163.
- Prasanna, V., Prabha T. N. and Tharanatha R. N. 2007. Fruit ripening phenomena – An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47: 1-19.
- Reid M. S. and Staby G. L. 2008. A brief history of 1-Methylcyclopropene. *HortScience* 43: 83-85.
- Rocco M., D'Ambrosio C., Arena S., Faurobert M., Scaloni A., and Marra M. 2006. Proteomic analysis of tomato fruits from two ecotypes during ripening. *Proteomics* 6: 3781-3791.
- Rodrigo M. J. Zacarias L. 2006. Effect of postharvest ethylene treatment on carotenoid accumulation and the expression of carotenoid biosynthetic genes in the flavedo of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 43: 14-22.
- Rosas-Cárdenas F. F. 2008. Proteómica de la maduración de tunas con características contrastantes. Tesis de Maestría en Ciencias. CINVESTAV-IPN, Unidad de Irapuato. Irapuato, Gto., México.

- Rose J. K. C., and Saladié M. 2008. Proteomic analysis and fruit ripening *Acta Horticulturae* 682: 211-224.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez R. G. 2008. La red de valor de la zarzamora: El cluster de Los Reyes, Michoacán un ejemplo de reconversión competitiva. Fundación Produce Michoacán, A.C. Morelia, Michoacán: Laser Impresores. 116.
- Sarry J. E, Sommerer N., Sauvage F. X., Bergoin A., Rossignol M., and Albagnac G. 2004. Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. *Proteomics* 4: 201- 215.
- Schuch W., Bird C. R., Ray J. and Smith C. J. S. 1989. Control and manipulation of gene expression during tomato fruit ripening. *Plant Molecular Biology* 13: 303–311.
- Selvaraj Y., Kumar R. and Pal D. K. 1989. Changes in sugars, organic acids, amino acids, lipid constituents and aroma characteristics of ripening mango (*Mangifera indica* L) fruit. *Journal of Food Science and Technology* 26: 308-313.
- Seymour G. B., Manning K., Eriksson E. M., Popovich A. H. and King G. J. 2002. Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. *Journal of Experimental Botany* 53 (377): 2065-2071.
- Searle S. R., Casella G., and McCulloch C. E. 1992. *Variance Components*. John Willey & Sons. New York. 528 p.
- Sharathchandra G. R., Stander C., Jacobson D., Ndimba B. and Vivier M. A. 2011. Proteomic analysis of grape berry cell cultures reveals that developmentally regulated ripening related processes can be studied using cultured cells. *PLoS ONE* 6 (2): e14708.

- SIAP.2015. Cierre de la producción agrícola por cultivo. <http://www.siap.gob.mx>. Consultado el 12 de junio de 2015
- Smirnoff N. 2000. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355: 1455–1464.
- SNIIM. 2008. Sistema Nacional de Información de Mercados. <http://www.economia-sniim.gob.mx/sicia/VerAgr.htm>. Consultado el 22 de enero de 2016
- Soto A., Ruiz K. B., Ravaglia D., Costa G. and Torrigiani P. 2013. ABA may promote or delay peach fruit ripening through modulation of ripening- and hormone-related gene expression depending on the developmental stage. *Plant Physiology and Biochemistry* 64: 11-24.
- Srivastava L. M. 2002. *Plant growth and development. Hormones and the environment*. Oxford: Academic Press. 722 pp.
- Stasyk T., Hellman U. and Souchelnytskyi S. 2001. Optimizing sample preparation for 2-D electrophoresis. *Life Science News, Amersham Biosciences* 9: 1-4.
- Strik B. C., Clark J. R., Finn C. E. and Bañados M. P. 2007. *Worldwide Blackberry Production*. HortTechnology 17: 205-213.
- Stroshine R. L. 1999. *Physical properties of agricultural materials and food products*. Department of Agricultural and Biological Engineering. West Lafayette, Ind. p. 113-152.
- Sun Y., Chen P., Duan C., Tao P., Wang Y., Ji. K, Hu Y., Li Q., Dai S., Wu Y., Luo H., Sun L. and Leng P. 2012. Transcriptional Regulation of Genes Encoding Key Enzymes of Abscisic Acid Metabolism During Melon (*Cucumis melo* L.) Fruit Development and Ripening *Journal of Plant Growth Regulation* 32: 233-244.

- Talcott, S.T. 2007. Chemical components of berry fruits. pp. 51-72. In: Yanyun Z. (ed.). Berry fruit, Value Added Products for Health Promotion. CRC Press.
- Takeda F., Tworkoski T., Finn C. E., and Boyd C. C. 2011. Blackberry propagation by non-leafy floricanne cuttings. HortTechnology 21: 236-239.
- Terrier N., Glissant D., Grimplet J., Barrieu F., Abbal P., and Couture C. 2005. Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. Planta 222: 832–847.
- Tucker G. A. and Grierson D., 1982. Synthesis of polygalacturonase during tomato fruit ripening. Planta 155: 64-67.
- Valero Ubierna, C. y Ruiz Altisent, M. 1996. Técnicas de medida de la calidad de frutas. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid. Departamento de Ingeniería Rural.
- Valledor L. and Jorrín J. 2011. Back to the basics: Maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. Journal of Proteomics 74: 1-18.
- Vendrel M. 1985. Dual effect of 2, 4-D on ethylene production and ripening of tomato fruit tissue. Physiologia Plantarum 64: 559-563.
- Vihinen M. 2001. Bioinformatics in proteomics. Biomolecular Engineering 18: 241-248.
- Wasinger V. C., Cordwell S. J., Cerpapojjak A., Yan J. X., Gooley A. A., and Wilkins M. R. 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. Electrophoresis 16:1090–1094.
- Wheeler S., Loveys B., Ford C. and Davies C. 2009. The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L.

- berry ripening by abscisic acid. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15: 195-204.
- Yang S. F. and Hoffman N. E., 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 155-189.
- Zapata L. M., Malleret A. D., Quinteros C. F., Lesa C. E., Vuarant C. O., Rivadeneira M. F. y Gerard J. A. 2010. Estudio sobre cambios de la firmeza de bayas de arándanos durante su maduración. *Ciencia, Docencia y Tecnología* 41: 159-171.
- Zhang C. F., Ding Z. S., Xu X. B., Wang Q., Qin G. Z. and Tian S. P. 2010. Crucial roles of membrane stability and its related proteins in the tolerance of peach fruit to chilling injury. *Amino Acids* 39:181–94.
- Zheng Q., Song J., Doncaster K., Rowland E. and Byers D. M. 2007. Qualitative and quantitative evaluation of protein extraction protocols for apple and strawberry fruit suitable for two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55:1663-1673.