UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

ANÁLISIS DE APROXIMACIÓN PROTEÓMICA EN FRUTOS DE GULUPA *Passiflora edulis* SIMS SOMETIDOS A DOS TEMPERATURAS POSCOSECHA

Sandra Carolina Crespo Cárdenas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2013

ANÁLISIS DE APROXIMACIÓN PROTEÓMICA EN FRUTOS DE GULUPA *Passiflora edulis* SIMS SOMETIDOS A DOS TEMPERATURAS POSCOSECHA

Sandra Carolina Crespo Cárdenas

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Bioquímica

Director (a):

Ph.D. Química, Nohora Angélica Vega Castro

Codirector (a):

Ph.D. Química, Luz Marina Melgarejo Muñoz

Línea de Investigación:

Proteómica vegetal

Grupo de Investigación:

Fisiología del estrés y Biodiversidad en plantas y microorganismos – Departamento de Biología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamentode Química

Bogotá, Colombia

2013

A mi mami:
Duras pruebas nos ha puesto la vida, pero una a una las superamos. Gracias.

A Danny:
El amor no se acaba, solo se transforma.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia por mi formación y profundización en el área de la bioquímica de proteínas

A Colciencias, la Universidad Nacional de Colombia, y Ocati S.A. por la financiación del proyecto “Efecto de las condiciones poscosecha sobre la fisiología, bioquímica, conservación y análisis proteómico en frutos de gulupa *Passiflora edulis* Sims”, dirigido por la profesora Luz Marina Melgarejo, y en el cual se enmarcó el presente trabajo de tesis

A mis directoras, profesora Luz Marina Melgarejo del departamento de Biología por su confianza, su aseoria y su amistad,. y a la profesora Nohora Angélica Vega del departamento de química de la Universidad Nacional de Colombia por permitirme ingresar a su grupo de investigación

Al laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal del departamento de biología, y al grupo de Investigación Fisiología del estrés y Biodiversidad en plantas y microorganismos del mismo departamento, donde realicé la parte experimental del proyecto de tesis.

Al profesor Jesús Jorrín de la Universidad de Cordoba, España, por su apoyo y gestión del servicio de secuenciación de proteínas en El Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI).

A Danny Rodríguez, por todo su apoyo su colaboración, su comprensión y su amor.

A mis compañeros de investigación que a lo largo del tiempo se volvieron mis amigos Leonardo Moreno, Yuly Valencia, Laura Pérez, Laura Flórez, Marisol Cruz, Fabio Martínez, Margarita Albis, Martha Jiménez, entre muchos otros.

A mi familia; mi mami Ligia, mi papi Andrés, mi tía Nohora, mi prima Katy, por darme el apoyo moral necesario para esta y todas las etapas de mi vida.

Resumen

La gulupa se ubica como la segunda passiflora y la tercera fruta de exportación en Colombia, alcanzando en el 2006 ventas por 1.7 millones de dólares a países como Alemania, Holanda, Bélgica, Inglaterra, Francia, Suecia y Canadá. En el presente trabajo se evalúan algunos parámetros fisicoquímicos que se utilizan comúnmente en estudios de fisiología poscosecha (textura, pérdida de peso, sólidos solubles, acidez titulable, pH) y se presenta un análisis de aproximación proteómica de frutos almacenados a 4°C y a 20°C, en empaque Makropool M. Se encontraron diferencias significativas entre las temperaturas de almacenamiento en los parámetros fisicoquímicos evaluados para las unidades experimentales almacenadas durante 24 y 32 días. Mientras que en el análisis de aproximación proteómica se encontró que las manchas de proteína que aparecen o aumentan su densidad óptica en los frutos almacenados a 20°C han sido reportadas como asociadas a la maduración del fruto. Mientras que aquellas relacionadas con el tratamiento a 4°C se encuentran relacionadas en su mayoría a eventos de estrés, como es el estrés por frío.

Palabras clave: Gulupa, proteómica, almacenamiento poscosecha**.**

Abstract

The Purple passion fruit ranks as the second passiflora and third fruit for export in Colombia, reaching in 2006 sales for $ 1.7 million to countries like Germany, Holland, Belgium, England, France, Sweden and Canada. In this work are evaluated some physicochemical parameters that are commonly used in studies of postharvest physiology (texture, weight loss, soluble solids, titratable acidity, pH) and it is presented an analysis of proteomic approach of fruits stored at 4 ° C and 20 ° C, in Makropool M package. Significant differences between storage temperatures on the physicochemical parameters evaluated for experimental units stored for 24 and 32 days were found, while the analysis of proteomic approach was found that protein spots that appear or increase their optical density in the fruits stored at 20 ° C have been reported as associated with fruit ripening, while those related to treatment at 4 ° C are found mostly related to stress events, such as cold stress .

Keywords: Gulupa, proteomics, postharvest storage.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XIII**

Lista de tablas ..... **XIV**

Introducción **15**

1. Capítulo 1: Marco Teórico **16**
1.1 Objetivo general 16
1.2 Objetivos específicos 16
1.3 Estado del arte 17
1.3.1 La gulupa 17
1.3.2 La poscosecha 18
1.3.3 Atmósferas modificadas/Controladas 19
1.3.4 Proteómica 20
1.3.5 Preparación de la muestra para su análisis por proteómica 20
1.3.6 Electroforesis bidimensional (2DE) 21
1.3.7 2DE diferencial 22
1.3.8 Cromatografía líquida multidimensional 23
1.3.9 Análisis por espectrometría de masas 25
1.3.10 Fuentes de ionización 25
1.3.11 Analizadores de masas 26
1.3.12 Proteómica en el estudio poscosecha de frutos 28

2. Capítulo 2: EVALUACIÓN DE CAMBIOS FISICOQUÍMICOS EN EL TIEMPO PARA FRUTOS DE GULUPA DURANTE EL ALMACENAMIENTO A 4°C Y 20°C **31**
2.1 Marco teórico 31
2.2 Diseño experimental 33
2.2.1 Muestras 33
2.2.2 Experimento 33
2.2.3 Análisis fisicoquímico 34
2.3 Resultados y análisis 35

3. Capítulo 3: SELECCIÓN DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DEL PROTEOMA DE GULUPA **41**
3.1 Marco teórico 41
3.2 Metodología 42
3.2.1 Metodologías de extracción de proteoma 42
3.3 Evaluación de las metodologías de extracción 44

3.3.1 Contenido de proteína 44
3.3.2 Electroforesis SDS-PAGE.....44
3.3.3 Tinción.....45
3.3.4 Análisis de imágenes obtenidas de los geles de electroforesis 46
3.4 Resultados y discusión.....46
3.4.1 Selección de la metodología de extracción 46

4. Capítulo 4: ANÁLISIS DE APROXIMACIÓN PROTEÓMICA PARA LOS CAMBIOS EN EL PROTEOMA DE GULUPA DEBIDOS AL ALMACENAMIENTO A DOS TEMPERATURAS DURANTE LA POSCOSECHA 53
4.1 Metodología 53
4.1.1 Extracción del proteoma de gulupa para frutos almacenados a 20°C y a 4°C 53
4.1.2 Determinación del contenido de proteína para frutos almacenados a 20°C y a 4°C.....53
4.1.3 Electroforesis unidimensional de los extractos de proteína obtenidos de frutos almacenados a 20°C y a 4°C 54
4.1.4 Electroforesis bidimensional para los extractos seleccionados de frutos almacenados a 20°C y a 4°C 54
4.1.5 Tinción de geles.....56
4.1.6 Análisis de imágenes de electroforesis unidimensionales.....56
4.1.7 Análisis de imágenes de electroforesis bidimensionales.....56
4.1.8 Análisis por espectrometría de Masas 57
4.1.9 Análisis bioinformático 58
4.2 Resultados y Análisis 59
4.2.1 Electroforesis unidimensional de los extractos de proteína obtenidos de frutos almacenados a 20°C y a 4°C 59
4.2.2 Electroforesis bidimensional para los extractos seleccionados de frutos almacenados a 4°C y a 20°C 64

5. Conclusiones generales.....73

6. Bibliografía General.....74

7. Productos obtenidos con el desarrollo del trabajo de tesis 82
Presentación de resultados obtenidos en congresos o simposios.....82

Lista de figuras

Pág.

Figura 2-1. Diseño experimental para la evaluación de cambios en frutos de gulupa almacenados a 4°C y 20°C. 33
Figura 2-2. Gráfica de intervalos para las coordenadas de color L, c*, h* obtenidas a lo largo del tiempo para los frutos almacenados a 4°C y 20°C. 37
Figura 2-3. Gráfica de intervalos para las mediciones de pH a lo largo del tiempo para los frutos almacenados a 4°C y 20°C..... 37
Figura 2-4. Gráfica de intervalos para las mediciones de Acidez Total Titulable a lo largo del tiempo para los frutos almacenados a 4°C y 20°C. 38
Figura 2-5. Gráfica de intervalos para las mediciones de sólidos solubles expresados como °Brix a lo largo del tiempo para los frutos almacenados a 4°C y 20°C. 38
Figura 3-1. Electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos mediante el método 1. 47
Figura 3-2. Electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos mediante el método 2.1. 48
Figura 3-3. Electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos mediante el método 3.1. 49
Figura 4-1. Electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos de frutos de gulupa almacenados a 20°C (carriles 1, 2 y 3), y 4°C (carriles 5, 6 y 7) en el día 8 de almacenamiento. El carril 4 corresponde al patrón de pesos moleculares. 60
Figura 4-2. Electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos de frutos de gulupa almacenados a 20°C (carriles 1, 2 y 3), y 4°C (carriles 5, 6 y 7) en el día 16 de almacenamiento. El carril 4 corresponde al patrón de pesos moleculares. 61
Figura 4-3. Electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos de frutos de gulupa almacenados a 20°C (carriles 1, 2 y 3), y 4°C (carriles 5, 6 y 7) en el día 24 de almacenamiento. Carril 4 patrón de pesos moleculares. 62
Figura 4-4. Electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos de frutos de gulupa almacenados a 20°C (carriles 1, 2 y 3), y 4°C (carriles 5, 6 y 7) en el día 32 de almacenamiento. Carril 4, patrón de pesos moleculares. 63
Figura 4-5. Vista de los geles obtenidos para los extractos de frutos almacenados a 4°C. 64
Figura 4-6. Vista de los geles obtenidos para los extractos de frutos almacenados a 20°C. 64
Figura 4-7. Master Gel obtenido mediante PDQuest®, con las manchas de proteína identificadas como diferenciales. 65

Lista de tablas

Pág.
Tabla 1-1. Resumen de investigaciones realizadas en proteómica de frutas desde el el año 2005 a la fecha. 29
Tabla 2-1. Resultados para la caracterización fisicoquímica de frutos de gulupa almacenados a 4°C y 20°C. 36
Tabla 3-1. Preparación de geles de poliacrilamida. 45
Tabla 3-2. Reactivos para tinción de geles con Coomassie coloidal G-250 de acuerdo al protocolo propuesto por Dyballa et al [89] 45
Tabla 3-3. Bandas para la electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos mediante el método 1. 47
Tabla 3-4. Bandas para la electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos mediante el método 2.1. 48
Tabla 3-5. Bandas para la electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos mediante el método 3.1. 49
Tabla 3-6. Contenido de proteína y número de bandas encontradas en la electroforesis unidimensional para las metodologías de extracción de la proteína de gulupa evaluadas. 50
Tabla 4-1. Protocolo de isoelectroenfoque para extractos proteicos de pulpa de gulupa. 55
Tabla 4-2. Bandas para la electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos de frutos de gulupa almacenados a 20°C (carriles 1, 2 y 3), y 4°C (carriles 5, 6 y 7) en el día 8 de almacenamiento. 60
Tabla 4-3. Bandas para la electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos de frutos de gulupa almacenados a 20°C (carriles 1, 2 y 3), y 4°C (carriles 5, 6 y 7) en el día 16 de almacenamiento. 61
Tabla 4-4. Bandas para la electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos de frutos de gulupa almacenados a 20°C (carriles 1, 2 y 3), y 4°C (carriles 5, 6 y 7) en el día 24 de almacenamiento. 62
Tabla 4-5. Bandas para la electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos de frutos de gulupa almacenados a 20°C (carriles 1, 2 y 3), y 4°C (carriles 5, 6 y 7) en el día 32 de almacenamiento. 63
Tabla 4-6. Manchas seleccionadas para la secuenciación. 66
Tabla 4-7. Identificación de la función de las proteínas secuenciadas. 71

Introducción

La gulupa se ubica como la segunda passiflora y la tercera fruta de exportación en Colombia, alcanzando en 2006 ventas por 1.7 millones de dólares a países como Alemania, Holanda, Bélgica, Inglaterra, Francia, Suecia y Canadá [1-4]. Es apetecida por su calidad nutricional (provitamina A, niacina, riboflavina y ácido ascórbico) y en general, por sus características organolépticas de sabor, aroma y acidez intermedia entre el maracuyá y la granadilla, lo cual permite su consumo en fresco [5].

Uno de los principales problemas en la producción frutícola de gulupa en Colombia son sus altas pérdidas, no inferiores al 40%, dado al desconocimiento de un adecuado manejo de cosecha y poscosecha. Para algunas empresas colombianas exportadoras de fruta, como es el caso de OCATI S.A., las pérdidas alcanzan hasta el 15% de la producción final de gulupa. Particularmente esta empresa manifiesta que en las condiciones de poscosecha trabajadas actualmente, los frutos se maduran o sobremaduran, lo que conlleva a pérdidas principalmente por problemas fitosanitarios antes que llegue al consumidor final, generando su rechazo cuando alcanzan el puerto de destino de exportación.

Por tanto, la gulupa es un objeto de investigaciones en fisiología y bioquímica del fruto, cuyo fin es mejorar el rendimiento en su cultivo, cosecha y poscosecha. Actualmente los estudios poscosecha se han llevado a un nivel más profundo utilizando análisis genómicos y proteómicos que permitan entender el metabolismo de un fruto durante las condiciones poscosecha comúnmente utilizadas para su conservación desde la cosecha hasta el consumo final [6-9].

1. Capítulo 1: Marco Teórico

1.1 Objetivo general

Realizar una aproximación de análisis proteómico comparativo de frutos de gulupa *Passiflora edulis* Sims sometidos a 4°C y 20°C durante su almacenamiento después de la cosecha.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar una metodología apropiada para la extracción del proteoma de gulupa *Passiflora edulis* Sims.
- Optimizar la separación del proteoma de frutos de gulupa *Passiflora edulis* Sims. por electroforesis bidimensional.
- Determinar algunos parámetros fisicoquímicos para frutos de gulupa sometidos a 4°C y 20° durante su almacenamiento después de la cosecha.
- Seleccionar y secuenciar algunas proteínas diferenciales durante el almacenamiento a 4°C y 20°C, previamente separadas por electroforesis bidimensional.

1.3 Estado del arte

1.3.1 La gulupa

La gulupa *Passiflora edulis* Sims. es una liana perenne y trepadora que con el tiempo se vuelve semileñosa, con largos zarcillos. Es originaria de Brasil y fue ampliamente distribuida durante el siglo XIX a otros países de América del Sur, el Caribe, Asia, India, África y Australia. Se adapta a las condiciones del trópico, entre los 1400 y 2200 m.s.n.m. ya que a alturas mayores la producción inicia a los 12 y 18 meses y el tamaño de la fruta es menor. En Colombia es conocida como curuba redonda, cholupa, maracuyá púrpura y cocorilla, y se produce en varios departamentos del país, aunque la mayor producción es en Cundinamarca. No se conoce exactamente el área total cultivada en el país, pero datos no oficiales lo aproximan a 700 ha [10].

El fruto es globoso u ovoide, morado y de 4 a 8 cm de diámetro. Presenta una gruesa cáscara (exocarpo) que a madurez final es de color púrpura. En el endocarpo (pulpa) hay muchas semillas de color café oscuro a negro incluidas en pequeños sacos llenos de jugo naranja-amarillo aromático [11]. Las plantas viven de 3 a 8 años [12]. El fruto puede permanecer hasta después de 70 días de la floración en la planta y alcanza las características óptimas de consumo después de la cosecha. Se pueden distinguir tres etapas en el desarrollo, nombradas como inmaduro, pintón y maduro; en general, se cosecha en estado pintón en el cual alcanza la madurez de consumo después de la cosecha. Los cambios durante la maduración están asociados a los cambios en el color de la cáscara; en la gulupa se han identificado 6 estados de madurez, se recomienda cosechar en el estado 3 que representa un 50% de color verde y un 50% de color púrpura [5].

Al igual que el maracuyá, la gulupa, es un fruto con un patrón de respiración climatérico [13] por lo que su maduración continúa después de la cosecha, con una variación compleja de sus características fisiológicas, bioquímicas y de composición. Este comportamiento climatérico hace importante la aplicación de tecnologías poscosecha para prolongar su vida útil, inclusive, hasta en un 50%.

En Colombia, debido a su importancia económica, ha sido objeto de múltiples estudios, desde el punto de vista fisiológico [14], de variabilidad genética en base a la

caracterización morfológica [10, 15, 16] y molecular usando marcadores moleculares/AFLP's [17].

1.3.2 La poscosecha

La calidad de los productos hortofrutícolas puede ser evaluada en términos de sus características fisicoquímicas, organolépticas y nutricionales que tiene el producto al llegar al consumidor final. Estas características dependen del correcto manejo del producto desde el cultivo, pasando por la cosecha y por último el almacenamiento previo y transporte hasta su uso final.

El adecuado manejo poscosecha debe tener en cuenta que los productos hortofrutícolas cosechados son organismos vivos, y que por tanto presentan un metabolismo activo. Así, desde la cosecha hasta el destino final se produce una serie de cambios a nivel biológico y químico, los cuales pueden ser manipulados para controlar la calidad del producto. Los principales cambios de composición durante la poscosecha se dan en compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, pigmentos, volátiles, minerales, vitaminas e incluso a nivel de macromoléculas como carbohidratos, lípidos y proteínas, todos los cuales están directamente relacionados con la calidad organoléptica y nutricional de las frutas y hortalizas. Dentro de los cambios biológicos involucrados en la poscosecha se encuentra la respiración, la producción de etileno, la transpiración (pérdida de agua), desórdenes fisiológicos (daños por enfriamiento o congelamiento), daños físicos y ataque de patógenos [18, 19].

Todos estos cambios están influenciados por factores medioambientales, así como del tratamiento que sufre el fruto durante la cadena de producción, la cual puede resumirse en los procesos precosecha, cosecha y poscosecha. Entre los factores precosecha que afectan el producto final está la selección de variedades genéticas apropiadas, las condiciones del cultivo y las buenas prácticas agrícolas, las cuales han de tenerse en cuenta en la cadena de producción ya que, en buena medida, definen la calidad del producto final. Por otra parte, durante la cosecha uno de los factores determinantes es el grado de madurez en el que el fruto es cosechado, debido a que está estrechamente relacionado con la calidad, composición y tiempo de almacenamiento, así como el método de cosecha, el cual debe ser adecuado para minimizar los daños mecánicos que

disminuyen la calidad del producto. En el caso de la poscosecha, se encuentran como factores críticos las variables de almacenamiento y transporte, como son las atmósferas modificadas, la temperatura, la humedad relativa, los métodos de manipulación, el empaque y el período de tiempo entre la cosecha y el consumo final [19].

1.3.3 Atmósferas modificadas/Controladas

Para retrasar los cambios químicos y biológicos que se llevan a cabo durante la poscosecha, se usan atmósferas modificadas o controladas cuyo objetivo es detener el mayor tiempo posible el deterioro del producto. Tanto la atmósfera modificada como la controlada cumplen esta función gracias a que permiten modificar la velocidad de respiración, la senescencia, los niveles de etileno y prevenir el ataque de patógenos. Durante los tratamientos con atmósferas modificadas se controlan principalmente la temperatura, la composición de la atmósfera y la humedad relativa durante el almacenamiento y transporte del producto cosechado.

Es común el uso de temperaturas bajas (inferiores a 15°C) durante las cuales se ven afectados los procesos de transpiración, respiración, producción de etileno y el crecimiento de patógenos. Sin embargo, el uso de temperaturas bajas puede conllevar a daños por frío o congelamiento los cuales afectan seriamente la calidad y tiempo de vida del producto, por lo cual es necesario determinar la temperatura óptima de almacenamiento de un fruto dado. Por otra parte, la pérdida de agua depende de la humedad relativa, y por tanto, ésta desempeña un papel vital en la conservación de la calidad del producto [19-22]. Un control más refinado se da gracias a la modificación de los niveles de oxígeno, dióxido de carbono y etileno, los cuales afectan directamente procesos como la respiración y la senescencia, y que se pueden controlar usando empaques con membranas semipermeables (atmósfera modificada) o modificando la atmósfera por adición o sustracción de gases (atmósfera controlada) [19, 22-24].

Como es lógico para controlar todas las variables antes mencionadas se hace necesario el uso de empaques con características apropiadas para cada producto. Estos empaques deben permitir, en la medida de lo posible, el control de dichas variables a un bajo costo y utilizando tecnologías amigables con el ambiente. Existen muchos tipos de materiales para la elaboración de empaques, cada uno con un uso específico, entre los cuales encontramos los de madera, papel, vidrio, metal y materiales poliméricos (plásticos). Los

últimos han tenido grandes desarrollos en los últimos años, y son ampliamente usados gracias a su fácil manipulación, bajo costo y características físicas que lo hacen buenas barreras contra la humedad y gases, y permeabilidad selectiva al oxígeno y dióxido de carbono [23, 25, 26].

1.3.4 Proteómica

Todos los cambios producidos en la fruta durante la poscosecha pueden ser evaluados a un nivel más profundo, teniendo en cuenta que todos estarán regulados por redes metabólicas en donde interactúa el genotipo y la expresión de proteínas. Actualmente la proteómica es una herramienta que permite comparar la expresión de proteínas para un mismo organismo sometido a distintas condiciones medioambientales. En el caso bajo estudio, la proteómica es una herramienta útil para evaluar proteínas en frutos u hortalizas sometidos a distintas condiciones poscosecha como atmósferas modificadas/controladas, bajas temperaturas de almacenamiento y/o diferentes tipos de empaque.

La proteómica permite estudiar mezclas grandes y complejas de proteínas extraídas de tejidos animales, vegetales o de bacterias. Este análisis es posible gracias a técnicas que permiten la separación de las proteínas de un organismo dado como por ejemplo la electroforesis bidimensional (2DE, por sus siglas en inglés), la electroforesis bidimensional diferencial (DIGE), y cromatografía líquida multidimensional [27].

1.3.5 Preparación de la muestra para su análisis por proteómica

El paso crítico en la evaluación del proteoma en cualquier organismo es la extracción de las proteínas en un sistema adecuado para realizar la separación e identificación posterior. En el caso de los tejidos vegetales la extracción puede ser compleja, ya que comúnmente contienen variedad de componentes que pueden interferir con la extracción, separación y purificación de proteínas, dentro de los que se encuentran los carbohidratos, las pectinas y las proteasas [28].

En general, los métodos de extracción se basan en tres procesos: ruptura de paredes y membranas celulares, extracción de las proteínas en un medio adecuado, concentración del proteoma extraído.

El método de ruptura de tejidos más común es la maceración con nitrógeno líquido, de manera que las macromoléculas de la célula quedan expuestas. Además, presenta la ventaja, de mantener baja la temperatura de manera que se minimiza la degradación de la muestra [28]. La extracción del proteoma se lleva a cabo en buffer, el cual está compuesto generalmente por Tris, SDS, fenol, DTT y glicerol o sacarosa; en los casos en los que el buffer incluye fenol se da una separación de fases, en donde las proteínas son extraídas en la fase fenólica, eliminándose de esa manera compuestos interferentes que son insolubles en dicha fase [28-35]. La concentración del proteoma extraído se hace generalmente por precipitación de las proteínas, usando solventes como acetona o metanol, y en algunos casos ácido tricloroacético (TCA).

1.3.6 Electroforesis bidimensional (2DE)

Es la combinación de dos técnicas reconocidas; el isoelectroenfoque (IEF) en la primera dimensión y la electroforesis SDS-PAGE en la segunda dimensión. La 2DE puede separar mezclas de hasta 5000 proteínas simultáneamente y además permite el estudio de modificaciones postraduccionales tales como glicosilaciones o fosforilaciones. La mayor ventaja de esta técnica es la separación de proteínas a las que posteriormente se les puede hacer un estudio de estructura primaria por medio de MALDI-TOF MS, ESI-MS o degradación de Edman [32, 36].

Durante el isoelectroenfoque las proteínas son separadas en un gel con un gradiente de pH inmovilizado, de tal manera que al aplicar una diferencia de potencial las proteínas se moverán hasta el punto del gel en el que el pH sea igual a su punto isoeléctrico (pI). Durante el experimento, es importante controlar los tiempos de aplicación del voltaje y la cantidad de proteína sembrada. En el pasado esta técnica presentaba una muy baja reproducibilidad debido a la dificultad de hacer un gradiente de pH inmovilizado, ese inconveniente se ha superado por el uso de las tiras de gradiente inmovilizado de pH (IPG), las cuales consisten de una matriz de poliacrilamida sobre la cual se encuentran copolimerizadas una serie de derivados que generan un gradiente de pH (1-13) estable y reproducible [37]. La siguiente dimensión consiste en la separación de las proteínas por su peso molecular usando el sistema de Laemmli [38], el tamaño típico de los geles es de 20 x 25 cm con un espesor de 1mm. No es necesario el uso de geles de concentración ya que las proteínas están zonificadas en las tiras IPG.

Una vez se ha realizado la separación del proteoma usando 2DE, es necesario identificar las proteínas separadas, para eso existen distintos métodos de visualización de las proteínas en el gel. La selección del método de detección debe tener en cuenta el objetivo del trabajo; en general, se espera que posea una alta sensibilidad, un rango linear dinámico y amplio, reproducibilidad y compatibilidad con metodologías post-electroforéticas como espectrometría de masas (MS). Entre los métodos universales el más usado es el de tinción con Coomassie brilliant blue debido a su bajo costo, fácil uso y compatibilidad con muchas técnicas subsiguientes de análisis de proteínas y caracterización como MS; este método es muy poco sensible (200-500ng de proteína por mancha), aunque su sensibilidad aumenta por su uso de dispersiones coloidales [39]. Otro método ampliamente utilizado es la tinción con plata, el cual es más sensible (1ng de proteína por mancha) y tiene un amplio rango lineal de respuesta a la concentración de proteína; aunque es un método más laborioso, y en algunos casos, menos reproducible [40]. Los métodos con resultados más confiables gracias a su mayor sensibilidad y el amplio rango dinámico linear de detección son aquellos apoyados en técnicas de fluorescencia o radio-marcaje, combinados con sistemas sensibles de detección electrónica; sin embargo, son costosos debido al uso de moléculas especiales o isótopos específicos de ciertos elementos [32].

Cuando las proteínas separadas en la 2DE han sido visualizadas se procede a comparar los geles que resultaron para distintos estados del proteoma de un individuo dado. En este caso es indispensable apoyarse en software ofrecidos comercialmente, que permiten evaluar manchas de las proteínas que aparecen, desaparecen (fueron inhibidas) o cambian su densidad e intensidad (cambio de abundancia). El primer paso es computarizar las imágenes en formato digital ya sea con el uso de escáneres de densidad o densitómetros. Las imágenes son procesadas para eliminar ruido de fondo y normalizarlas, luego se hace la selección de las manchas presentes en cada gel y se comparan geles en busca de diferencias.

1.3.7 2DE diferencial

Esta técnica disminuye los errores analíticos debido a las diferencias entre geles ya que las dos muestras son separadas en el mismo gel. Esto es posible gracias a que dos (o más) muestras son marcadas *in vitro* usando dos diferentes moléculas con fluorescencia

que tienen longitudes de onda de excitación distintas. Las muestras marcadas son mezcladas y luego son sometidas a un IEF y posterior SDS-PAGE. Para ver las proteínas separadas en los geles estos son excitados a las dos longitudes de onda de fluorescencia de los correspondientes marcadores, posteriormente la imagen es adquirida y es posible hacer el análisis de estas para determinar la diferencias en expresión de proteínas entre los dos estados bajo estudio [41].

1.3.8 Cromatografía líquida multidimensional

La proteómica utilizando cromatografía líquida acoplada a masas es llamada "shotgun proteomics". En general, consiste en la digestión enzimática sobre una mezcla de proteínas, los péptidos obtenidos son separados por cromatografía líquida multidimensional y luego introducidos en un espectrómetro de masas para su secuenciación. El mayor problema con este tipo de proteómica es que muchos péptidos son generados por el análisis de masas espectral, por lo que no es posible lograr una secuencia completa de proteína. Otra desventaja es la interferencia debida a que distintas proteínas pueden presentar la misma secuencia en un péptido dado. A pesar de estos inconvenientes, esta es una herramienta útil y rápida para los estudios comparativos en proteómica y actualmente es ampliamente utilizada en estudios de proteómica en todo tipo de seres vivos.

La cromatografía líquida multidimensional se refiere al uso de dos “dimensiones” para hacer la separación de los péptidos antes del análisis en el espectrómetro de masas. Se usan dos dimensiones, donde la primera puede ser una cromatografía de exclusión, afinidad o intercambio iónico, o bien, puede ser no cromatográfica como geles de poliacrilamida o isoelectroenfoque. La segunda dimensión es frecuentemente una cromatografía en fase reversa, ya que es la que presenta menores interferencias para el acople a espectrometría de masas. Este tipo de proteómica puede ser desarrollada sin marcaje o con marcaje isotópico, tal como se describe a continuación [42].

- Proteómica “shotgun” sin marcaje

Este método tiene como objetivo determinar proteínas diferencialmente expresadas en dos o más muestras biológicas, y se basa en la intensidad de la señal del ion precursor. Existen tres pasos fundamentales: la preparación de la muestra (extracción de la

proteína), la reducción, la alquilación y digestión, y la separación usando cromatografía líquida multidimensional [27].

- Proteómica basada en marcaje con isótopos estables

SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture). Es un tipo de marcaje metabólico ya que aminoácidos esenciales marcados son adicionados a un medio de cultivo deficiente de aminoácidos, de manera que son incorporados en todas las proteínas que son sintetizadas por el organismo. En esta técnica no es necesario ningún marcaje químico ni purificación por cromatografía de afinidad, además es compatible con casi cualquier condición de cultivo [43].

ICAT (Isotope-Coded Affinity Tags) es un método versátil de marcaje químico para la cuantificación en proteómica. ICAT es un tipo de molécula que contiene un grupo reactivo con especificidad hacia grupos sulfidrilo, una estructura capaz de incorporar isótopos y un sitio de afinidad con biotina. La molécula existe en dos formas, una liviana y una pesada, dependiendo de si tiene o no deuterio en 8 sitios específicos. El método ICAT incluye tres pasos sucesivos: Primero se derivatizan los grupos sulfidrilo de una proteína reducida con el reactivo liviano, de igual manera se hace con péptidos provenientes de un condición experimental diferente pero con el reactivo pesado. En segundo lugar, los péptidos etiquetados son aislados por cromatografía de afinidad con avidina y luego son analizados por cromatografía líquida acoplada a masas. En el último paso se da tanto la cuantificación como la identificación de las proteínas que fueron marcadas [44]. ICAT se ha utilizado para estudiar los proteomas de organelos y proteínas de membrana en *Arabidopsis* [45].

iTRAQ (Isobaric Tag For Relative And Absolute Quantification) es otro método de marcaje químico que implica el marcaje de péptidos de diferentes muestras en la región amino terminal y en los grupos amino de las cadenas laterales, esto se hace con etiquetas covalentes codificadas con isótopos que varían su masa. Las muestras diferencialmente marcadas son mezcladas y fraccionadas por cromatografía líquida antes del análisis por espectrometría de masas, en el cual se realiza la cuantificación e identificación de los péptidos [46].

1.3.9 Análisis por espectrometría de masas

La espectrometría de masas se ha empleado como la herramienta más versátil y completa para los análisis de proteómica. Esta técnica nos permite medir los iones derivados de las proteínas o de los fragmentos de éstas en función de la relación masa/carga (*m/z*) que posean. Para este fin, el espectrómetro de masas debe contar con tres componentes fundamentales, que son la fuente de ionización, el analizador de masa y el detector [47]. Otro factor importante para la determinación de una secuencia de proteínas por espectrometría de masas es la exactitud con la que la medida es hecha, esto para poder diferenciar entre aminoácidos que pueden diferir en 1Da.

Los datos obtenidos por MS/MS son usados para predecir la secuencia de las proteínas de las cuales se originaron los péptidos. Los productos esperados de las digestiones teóricas de las proteínas de cualquier genoma secuenciado pueden ser usados para catalogar los posibles iones paternos. Estos resultados esperados son comparados con los obtenidos, y se asignan puntajes que indican la probabilidad de identificar la proteína. Para este tipo de análisis se encuentran disponibles algoritmos como MASCOT o SEQUEST, los cuales cuentan con una variedad de métodos de procesamiento, incluyendo digestión de varias enzimas o la adición de marcadores ICAT. En el caso en el que no se dispone del genoma secuenciado, la caracterización se hace más difícil, este proceso es conocido como secuenciación *de novo*, para ello se encuentran dos algoritmos disponibles conocidos como FASTA y BLAST [48].

1.3.10 Fuentes de ionización

La espectrometría de masas de proteínas y péptidos requiere de métodos de ionización suaves, capaces de transferir estos analitos a la fase gaseosa sin que se presente una degradación extensa, sin importar la alta polaridad, la poca volatilidad y la inestabilidad térmica que presentan estas macromoléculas. Así que, para hacer proteómica moderna por espectrometría de masas se cuenta principalmente con dos técnicas de ionización suave: la ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI), y la ionización electrospray (ESI) [47].

Ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI): En la técnica MALDI los iones son desorbidos de una fase sólida. Con este fin, el analito es disuelto en un solvente adecuado, mezclado con una excesiva cantidad de matriz apropiada y secado bajo una

corriente de nitrógeno, permitiendo que los analitos cristalicen junto con la matriz. Esta muestra finalmente se irradia con un láser (usualmente de nitrógeno a una longitud de onda de 337 nm), donde la matriz absorbe la mayor cantidad de energía y la transfiere a los analitos, resultando en la ionización y desorción de la matriz y de los iones $[M + H]^+$ del analito hacia la fase gaseosa. La ionización MALDI requiere varios cientos de disparos del láser para lograr una señal-ruido aceptable para la detección de los iones del analito. Los iones generados por MALDI son predominantemente de carga simple, lo que permite que esta técnica pueda emplearse en un análisis top-down de proteínas de alto peso molecular. Sin embargo, las desventajas que presenta MALDI se deben a la baja reproducibilidad de ionización/desorción entre los disparos del láser y a la fuerte dependencia del método de preparación que se debe hacer a la muestra [49, 50].

Ionización electrospray (ESI): A diferencia de MALDI, la ESI produce iones de los analitos cuando están disueltos en solventes, preferiblemente polares. La ESI es impulsada por un voltaje de 3 a 4 KV que se aplica entre el emisor en el final de la tubería de separación y la entrada del espectrómetro de masas. El proceso fisicoquímico de la ESI implica la creación de un espray cargado eléctricamente, seguido por la formación y desolvatación de gotas de analito/solvente, la cual puede ser favorecida con la ayuda de un gas neutro caliente (generalmente Nitrógeno). A estas condiciones, las gotas se rompen, reduciéndose continuamente su tamaño. Finalmente, las fuerzas de repulsión entre las partículas cargadas es tan alta, que llega a superar la tensión superficial del disolvente, dando lugar a la desorción de los iones del analito hacia la fase gaseosa [49].

1.3.11 Analizadores de masas

Los analizadores de masas son una parte integral del espectrómetro de masas, ya que es capaz de almacenar y separar los iones de los analitos provenientes de la fuente de ionización basándose en las relaciones de *m/z*. Actualmente los analizadores de masas empleados en proteómica son: cuadrupolo (Q), trampa de iones (IT), ciclotrón de resonancia de iones con transformada de Fourier (FT-ICR), Orbitrap y tiempo de vuelo (TOF). Estos analizadores varían en términos de tamaño, precio, resolución, rango de masas y capacidad para llevar a cabo experimentos de espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

Analizador de cuadrupolo (Q): El analizador de cuadrupolo está constituido por cuatro rodillos paralelos. A dos de estos rodillos se les aplica una corriente contínua (DC), mientras que los restantes están vinculados por un potencial de radiofrecuencia. Los iones, en esta región de campo variable, oscilarán dependiendo del campo de radiofrecuencia aplicada, así como de su relación *m/z*, por lo que el campo creado actúa a modo de filtro, determinando qué iones alcanzarán el detector. A pesar de ser un analizador económico, robusto, Q tiene una capacidad limitada en términos de rango de masas (Usualmente < 4000 Da) [49].

Analizador de trampa iónica (IT): El analizador IT funciona con un principio similar al empleado por Q. IT está conformado por tres electrodos: un electrodo anular, un electrodo de entrada y un electrodo de salida, formando una cavidad en la cual es posible almacenar y analizar los iones de los analitos. Una de las características del analizador IT es su capacidad para aislar un ión y fragmentarlo, generando el espectro de fragmentación o espectro MS/MS, que contiene la información acerca de la secuencia del péptido aislado [51].

Ciclotrón de resonancia de iones con transformada de Fourier (FT-ICR): El analizador FT-ICR se basa en la acción que ejerce un campo magnético sobre una partícula cargada (ión) girando en un campo de radiofrecuencia. Mediante el campo magnético los iones son dirigidos al interior de una caja donde giran describiendo una órbita de diámetro reducido y mínima frecuencia. Por aplicación de una señal de radiofrecuencia los iones son excitados a describir órbitas espirales de amplitud creciente, hasta que la órbita descrita alcance alguno de los dos electrodos detectores, momento en el cual originan una imagen de corriente, que es función directa de su relación m/z. Esta imagen de corriente es integrada mediante una transformada de Fourier y convertida en una señal proporcional a su intensidad. El espectro completo se obtiene mediante un barrido del campo de radiofrecuencia aplicado que varía entre 8 KHz y 100 MHz. El FT-ICR presenta como ventaja la alta precisión en la medida de masas y el poder de resolución casi ilimitado. Por el contrario, su costo es muy elevado y el nivel de vacío es un parámetro crítico en su funcionamiento [52, 53].

Orbitrap: El analizador de masas Orbitrap utiliza la trampa orbital de iones en sus campos electrostáticos, en el cual, los iones orbitan alrededor de un electrodo central y oscilan en la dirección axial. Al igual que el ICR, orbitrap también usa el algoritmo de la

transformada de Fourier para convertir la señal del tiempo-dominio en un espectro de m/z. El analizador Orbitrap se caracteriza por tener alta resolución, alta precisión y un rango de análisis de m/z de 6000 [47].

Tiempo de vuelo (TOF): El analizador TOF simplemente se basa en el libre vuelo de las moléculas ionizadas en un tubo de 1 a 2 m de longitud, antes de llegar al detector. Como los iones poseen la misma energía pero diferentes masas alcanzarán el colector a diferentes tiempos, dependiendo de su masa, carga y energía cinética. El TOF combinado con MALDI o con ESI permite la detección de macromoléculas que van mucho más allá de los mega Dalton en rango de masas [49].

1.3.12 Proteómica en el estudio poscosecha de frutos

Durante los últimos años se han incrementado los estudios en proteómica de frutas y vegetales, cuyo fin ha sido el desarrollo de metodologías de extracción del proteoma que sean eficientes para este tipo de matriz, así como la identificación de proteínas relacionadas con procesos metabólicos como la maduración y la senescencia, además de aquellas involucradas a la respuesta del fruto a estímulos externos como las atmósferas modificadas durante las poscosecha. La **¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.** resume algunas investigaciones hechas en este campo desde el año 2005 a la actualidad.

Los estudios de la **¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.** muestran que el uso de proteómica como herramienta de estudio de frutos se centra en dos áreas: el estudio de los cambios en el metabolismo durante la maduración (Pre/pos climatérico) y el estudio de los cambios producidos por estímulos externos durante el almacenamiento de la fruta (Temperatura, atmósfera modificada/controlada).

Para estudios relacionados a los cambios en el proteoma durante la maduración de frutos climatéricos como el banano [54], la manzana [36], la papaya [55], el durazno [8, 56] y el kiwi [57], se han reportado que las proteínas que presentan cambios son principalmente las quitinasas, las proteínas responsables de la respuesta al estrés, las proteínas de choque térmico, las proteínas relacionadas a la síntesis de etileno y de precursores de carotenoides.

Por otra parte, en cuanto a los frutos no climatéricos como la uva [58, 59] y la fresa [60] se ha reportado la sobre expresión de proteínas relacionadas a la fotosíntesis, metabolismo de carbohidratos, respuesta al estrés, así como proteínas relacionadas con el metabolismo/síntesis secundario de componentes celulares y transducción de señales.

Tabla 1-1. Resumen de investigaciones realizadas en proteómica de frutas desde el el año 2005 a la fecha.

Material Vegetal	Objetivo de la investigación	Número de proteínas identificadas	Referencias
Tomate (*Solanum lycoperisum*)	Maduración	68	Faurobert et al., 2007 [6]
		83	Rocco et al., 2006[61]
		22	Casado-Vela et al., 2005 [62]
	Preparación de muestra	17	Saravanan and Ross, 2005[63]
Durazno	Maduración	4	Abdi et al., 2002 [29]
	Trastornos de pardeamiento	78	Pedreschi et al., 2007 [64]
	Daños por frío	39	Nilo et al., 2009 [8]
	Condiciones extremas de gases	43	Pedreschi et al. 2009 [9, 65]
Strawberry (*Fragaria anasi*)	Preparación de muestra	13	Zheng et al., 2007 [36]
	Alérgenos	33	Hijerno et al., 2006 [66]
Banano (Musa spp.)	Preparación de muestra	1	Song et al., 2006 [67]
	Estrés osmótico	43	Carpentier et al., 2005 [30]
	Maduración	50	Toledo et al., 2012 [54]
Manzana (*Malus domestica*)	Maduración	32	Guarino et al., 2007 [68]
	Maduración/tratamiento con etileno	60	Zheng et al., [36]
	Alérgenos	5	Herndl et al., 2007 [69]
Naranja (*Citrus sinensis* L)	Maduración	36	Muccilli et al., 2009 [7]
Uva	Maduración	60	Deytieux et al., 2007 [58]
Cítricos	Poscosecha/tratamiento térmico	63	Yun et al., 2010 [70]
Kiwi	Maduración	102	Minas et al., 2012 [57]
Naranja	Proteoma completo (Shotgun)	1400	Katz et al., 2007 [71]

Para el caso de frutas como el limón y durazno, se han realizado estudios para conocer el efecto del choque térmico previo al almacenamiento. Para el caso del limón almacenado a bajas temperaturas se reportaron cambios para proteínas relacionadas con el metabolismo de polisacáridos y azúcares, metabolismo secundario y respuesta a estímulos [70]. Por otra parte, en durazno almacenado de 0°C a 5°C se reportó una cambio importante en proteínas relacionadas con la estabilidad de la membrana, producción de compuestos fenólicos y metabolismo de azúcares [72].

Por último, existe un gran número de estudios para frutos almacenados en atmósferas controladas/modificadas. Pedreschi, et al [64, 73] reportaron que para peras almacenadas en atmósfera controlada existen cambios asociados al metabolismo energético y proteínas de respuesta al estrés.

Los esfuerzos de todos estos estudios están dirigidos a mantener el rendimiento y la calidad de los frutos. Para continuar los estudios en esta dirección es necesario trabajar no sólo en la proteómica sino también en la genómica, ya que actualmente sólo unos pocos genes han sido identificados en frutas como determinantes de la calidad de frutas. En 2007 Jaillon et al. [74] presentaron el genoma completo para grape berry, lo que es un gran avance en este campo. Otra área prometedora alrededor de esta temática son los estudios de proteínas basados en micro-arrays que ofrecen la posibilidad de estudiar proteínas usando anticuerpos, lo que permite evaluar un gran número de proteínas, sus relaciones y actividad bioquímica [75]. Los ensayos de inmuno-localización combinados con las técnicas de adquisición de imágenes fluorescentes pueden ayudar a determinar la expresión, localización y actividad de ciertas proteínas, información importante para el entendimiento de vías metabólicas [76].

2. Capítulo 2: EVALUACIÓN DE CAMBIOS FISICOQUÍMICOS EN EL TIEMPO PARA FRUTOS DE GULUPA DURANTE EL ALMACENAMIENTO A 4°C Y 20°C

2.1 Marco teórico

La determinación del estado de madurez en los frutos es de vital importancia para su comercialización, puesto que asegura las características organolépticas requeridas por el consumidor. Para establecer que un fruto se encuentra en un estado de madurez óptimo se utiliza el índice de maduración, que depende de cada fruta, y que puede relacionarse a los cambios de color, concentración de sólidos solubles, la acidez titulable y la firmeza. Para algunas frutas de interés comercial, se encuentran reportados los índices de madurez mínimos, los cuales fueron establecidos por el Departamento de Agricultura y Comida de California, de manera que se asegura la calidad de la fruta disponible para el consumidor [77].

En cuanto al análisis fisicoquímico de gulupa, Jiménez et al. [78] reportaron una comparación de los parámetros físicoquímicos del fruto en tres estados de madurez, encontrando que los sólidos solubles aumentan y la acidez titulable disminuye cuando el fruto se encuentra maduro. En cuanto al análisis de color, reportaron una variación importante en la coordenada a*, la cual aumenta de forma importante durante el proceso de maduración.

Por otra parte, el proceso de maduración de un fruto climatérico durante la poscosecha se verá afectado por la manipulación que se haga del mismo durante el transporte y comercialización. Por tanto, la evaluación de los cambios de los parámetros fisicoquímicos asociados a tratamientos durante dicha manipulación permite la evaluación de las buenas prácticas, y de empaques óptimos para el proceso.

La selección de un empaque adecuado para el almacenamiento de la fruta permitirá la generación de atmósferas modificadas y/o controladas, es decir atmósferas en las cuales se controla la concentración de los gases que afectan el metabolismo del fruto durante la maduración como es el caso del O_2, CO_2 y etileno, entre otros. De hecho se ha demostrado que concentraciones de O_2 inferiores al 8% y de CO_2 superiores a 1% retardan el proceso de maduración, disminuyen la tasa de respiración, y en combinación con el control de la concentración de etileno resulta en un retraso en la senescencia, de manera que se retiene por un tiempo mayor la cantidad de clorofila, la textura, y la calidad organoléptica del fruto [79].

En cuanto a los tipos de empaques, se pueden encontrar múltiples clasificaciones, de acuerdo al material del que están constituidos y su capacidad permeable a los gases de interés. Dentro de las tecnologías recientes, se encuentran los empaques inteligentes, los cuales se han diseñado para informar sobre la calidad del alimento empacado, mediante el uso de indicadores por ejemplo de tiempo, temperatura, nivel de oxígeno, nivel de CO_2 o de crecimiento bacteriano. Por otra parte, se encuentran los empaques activos los cuales contienen aditivos capaces de intervenir en los procesos fisiológicos del fruto, de manera que pueden retardar el proceso de maduración [79].

El objetivo del presente estudio fue evaluar parámetros fisicoquímicos en frutos de gulupa con el fin de determinar los cambios producidos por el almacenamiento, y el momento determinante para toma de muestras para el análisis proteómico. Para ello se utilizó el empaque Makropool M y dos temperaturas de almacenamiento: 4°C y 20°C. El empaque Makropol M se caracteriza por ser un empaque anti-empañante de LDPE-Span (1%), el cual fue diseñado y producido por el Laboratorio de polímeros del Departamento de química de la Universidad Nacional de Colombia, dicho grupo de investigación demostró las propiedades ventajosas de dicho empaque frente a empaques comerciales [79].

2.2 Diseño experimental

2.2.1 Muestras

Se recolectaron 81 frutos a un 75% de maduración, medido a partir del color del fruto con un colorímetro (HUNTER LAB MiniScan® EZ): 75% púrpura /25% verde y de acuerdo a la edad del fruto reportado como días después de la antesis o apertura floral (107 a 112d). Se seleccionó este estado de maduración por resultados previos del grupo de investigación, que indicaron que en este punto de madurez el fruto es capaz de desarrollar la mejor calidad organoléptica en el tiempo necesario de almacenamiento y transporte para la llegada del producto al consumidor final (datos no publicados). La recolección de frutos se realizó en el municipio de Granada, Cundinamarca (Coordenadas: N 04° 30.150' WO 74° 21.532', Altitud: 2175 msnm). Los frutos fueron desinfectados por inmersión en una solución al 5% de hipoclorito de sodio, seguida de una inmersión en etanol al 70%, y un lavado abundante con agua esterilizada.

2.2.2 Experimento

La unidad experimental consistió de un grupo de tres frutos almacenados en bolsas Makropol M cada una de las cuales fue marcada con un número del 1 al 27, y su conjunto fue pesado para la determinación del porcentaje de pérdida de peso en el experimento.

Figura 2-1. Diseño experimental para la evaluación de cambios en frutos de gulupa almacenados a 4°C y 20°C.

Día 0	Día 8	Día 16	Día 24	Día 32	
U25 U26 U27	U22 U18 U01	U04 U12 U21	U08 U10 U15	U03 U17 U20	4°C
	U14 U02 U19	U05 U23 U24	U06 U09 U11	U16 U07 U13	20°C

Ui corresponde a la unidad experimental que comprende 3 frutos de gulupa en una bolsa Maropol M

Posteriormente, 12 bolsas fueron asignadas aleatoriamente para el almacenamiento a 4°C, 12 bolsas para el almacenamiento a 20°C y 3 bolsas para el análisis del día cero del experimento. Cada ocho días, y durante 32 días, tres unidades experimentales fueron seleccionadas aleatoriamente entre aquellas almacenadas a cada temperatura (La unidad experimental consistió de un grupo de tres frutos almacenados en bolsas Makropol M cada una de las cuales fue marcada con un número del 1 al 27, y su conjunto fue pesado para la determinación del porcentaje de pérdida de peso en el experimento.

Figura 2-1). Se determinó la masa total de la unidad experimental, y se realizaron las medidas fisicoquímicas en la pulpa de los respectivos frutos.

2.2.3 Análisis fisicoquímico

El análisis de Porcentaje de Pérdida de peso se llevó a cabo sobre la unidad experimental completa, es decir, tres frutos en su correspondiente bolsa. Los análisis de color y Firmeza se determinaron para cada fruto por duplicado en la zona ecuatorial. Para los análisis de pH, Acidez Titulable y °Brix se extrajo la pulpa (eliminando las semillas) de los tres frutos de cada unidad experimental y se realizó la determinación por triplicado para cada parámetro. Las determinaciones se realizaron con base en lo descrito por Melgarejo, L en el libro “Poscosecha de la Gulupa (*Passiflora edullis* SIMS)”.

Porcentaje de Pérdida de peso (%P/P): Se determinó como el porcentaje de pérdida de peso de cada unidad experimental entre el día cero y el día de procesamiento de la muestra.

a. Color: El color de los frutos fue determinado con un colorímetro HUNTER LAB MiniScan® EZ en la escala L (Luminosidad), c*(Croma), h*(Angulo Hue). Se tomaron 2 medidas por cada fruto, reportando el promedio de 6 medidas para la unidad experimental correspondiente.

b. Firmeza: La firmeza se determinó por triplicado midiendo la presión (KgF) necesaria para romper la cáscara del fruto en la zona ecuatorial del mismo, usando un penetrómetro WAGNER con una cabeza de 6mm de diámetro.

c. pH: El pH fue determinado por triplicado sobre la pulpa extraída de cada unidad experimental utilizando un pHmetro Shott Gerate CG820 [80].

d. Ácidez Total Titulable (AT): La acidez titulable (AT) se determinó mediante titulación de 2 g de pulpa con NaOH 0.1 N usando fenolftaleina como indicador, de manera que la acidez titulable se calculó a partir de la cantidad de base (NaOH) necesaria para alcanzar el pH del punto final de la prueba (pH = 8.5). El resultado se expresó en términos de la cantidad del ácido orgánico más abundante, en el caso de la gulupa el ácido cítrico [80].

e. Sólidos Solubles (°Brix): Los sólidos solubles, expresados como °Brix, se determinaron por triplicado a partir la pulpa extraída de los frutos de cada unidad experimental, usando un refractómetro HANNA H19682.

2.3 Resultados y análisis

La Tabla 2-1 muestra los resultados para las medidas de caracterización fisicoquímica realizadas sobre las unidades experimentales almacenadas a 4°C y 20°C y evaluadas cada 8 días. En esta tabla se señalan los casos en los cuales se presentaron diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0,05$) entre unidades experimentales sometidas a las dos temperaturas de estudio en un mismo día. El análisis estadístico se llevó a cabo en el paquete R[1].

Según estos resultados la AT, el pH y los sólidos solubles expresados como °Brix son buenos indicadores de los cambios sufridos por el fruto durante el ensayo de almacenamiento a dos temperaturas, puesto que son aquellos los que presentan diferencias significativas entre tratamientos, sobre todo para las dos últimas semanas del experimento.

La

[1]R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URLhttp://www.R-project.org/.

	Temperatura de almacenamiento				
	4°C	**20°C**		**4°C**	**20°C**
Día	L[f]		Día	pH	
0	33,2±2,8	33,2±2,8	0	2,5±0,0	2,5±0,0
8	35,0±0,5	35,5±0,8	8	2,5±0,1	2,6±0,1
16	35,2±0,7	35,7±0,4	16	2,5±0,0	2,6±0,1
24	34,1±0,8	35,6±1,8	24	2,6±0,0a	2,8±0,1b
32	36,6±1,7	35,8±0,4	32	2,6±0,1a	2,8±0,1b
Día	c*[g]		Día	Firmeza[d]	
0	7,2±0,5	7,2±0,5	0	5,5±0,6	5,5±0,6
8	8,1±0,2a	7,2±0,4b	8	4,7±0,8	3,8±0,5
16	7,3±0,7	7,0±0,5	16	6,6±0,9	5,2±0,3
24	6,1±0,4	7,3±1,1	24	5,0±0,7	4,7±0,8
32	9,1±1,8	9,0±1,3	32	5,5±0,2	6,1±0,8
Día	h*[h]		Día	AT[e]	
0	66,6±3,4	66,6±3,4	0	4,9±0,1	4,9±0,1
8	71,4±5,0	69,0±6,2	8	5,3±0,1a	4,1±0,2b
16	72,5±4,7	74,3±5,5	16	5,3±0,3a	4,0±0,6b
24	70,5±4,0	64,3±13,9	24	4,4±0,4a	3,1±1,0b
32	66,8±4,5	73,4±9,7	32	4,9±0,2a	3,0±0,2b
Día	% PP[c]		Día	Sólidos solubles	
0	0,0±0,0	0,0±0,0	0	12,6±0,2	12,6±0,2
8	1,9±1,5	0,5±0,4	8	12,9±0,7	12,2±0,5
16	1,2±0,4	2,4±1,5	16	13,4±0,7	12,8±1,4
24	0,9±1,1	1,2±0,6	24	12,6±0,3	11,6±0,9
32	0,9±0,8	1,6±1,7	32	12,5±0,4a	11,0±0,6b

a-b letras diferentes significa que existen diferencias significativas basadas en la prueba Tukey ($p<0,05$) en una misma fila. n=4.
c=% Pérdida de peso
d=KgF
e=Acidez Titulable meq de Acido Cítrico/g material vegetal
f=Luminocidad
g= Chroma
h=Hue

Figura 2-2 ilustra los resultados obtenidos para los cambios en las coordenadas de color. Para la evaluación del color existen diferentes “espacios” expresados en coordenadas, para sistemas informáticos el más común es el espacio Lab; sin embargo, su interpretación manual puede ser complicada debido a la posibilidad de valores negativos, por lo cual comúnmente dichas coordenadas son transformadas al espacio LCh. En el espacio LCh, la coordenada L se refiere a la luminosidad, se expresa en valores de 0 a 100. El valor C (Chroma) indica la saturación del color, expresado en valores de 0 a 100, de manera que a menores valores se acerca al eje de los grises. Por último el parámetro h (Hue) indica el tono, se expresa en grados, de 0° a 360°, y su aumento se da en un movimiento contrario a las agujas del reloj [81, 82]. Los resultados muestran que no

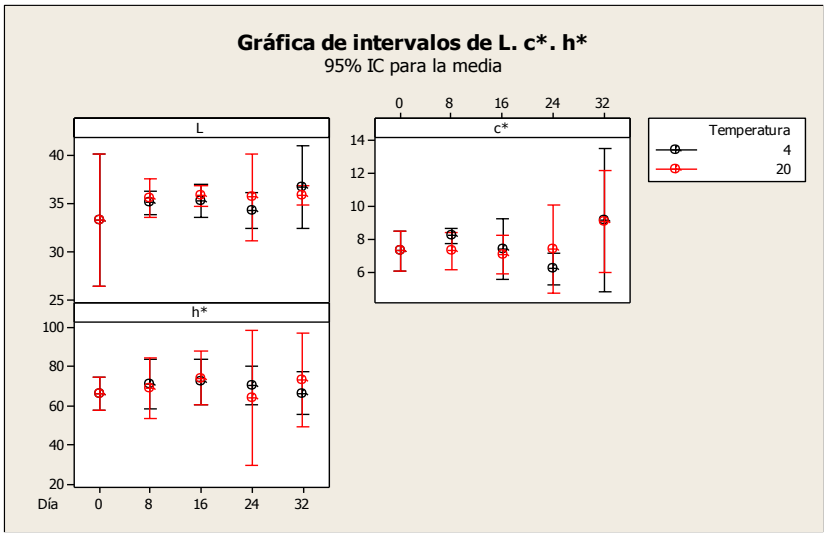
existen diferencias significativas para las coordenadas L y h debidas a las dos temperaturas de almacenamiento, y solo se encontró diferencias en la coordenada c para el día 8; sin embargo, ya que no se observa una tendencia para dicha coordenada puede creerse que la diferencia es debida a una heterogeneidad de los frutos.

Tabla 2-1. Resultados para la caracterización fisicoquímica de frutos de gulupa almacenados a 4°C y 20°C.

	Temperatura de almacenamiento				
	4°C	**20°C**		**4°C**	**20°C**
Día	L[f]		Día	pH	
0	33,2±2,8	33,2±2,8	0	2,5±0,0	2,5±0,0
8	35,0±0,5	35,5±0,8	8	2,5±0,1	2,6±0,1
16	35,2±0,7	35,7±0,4	16	2,5±0,0	2,6±0,1
24	34,1±0,8	35,6±1,8	24	2,6±0,0a	2,8±0,1b
32	36,6±1,7	35,8±0,4	32	2,6±0,1a	2,8±0,1b
Día	c*[g]		Día	Firmeza[d]	
0	7,2±0,5	7,2±0,5	0	5,5±0,6	5,5±0,6
8	8,1±0,2a	7,2±0,4b	8	4,7±0,8	3,8±0,5
16	7,3±0,7	7,0±0,5	16	6,6±0,9	5,2±0,3
24	6,1±0,4	7,3±1,1	24	5,0±0,7	4,7±0,8
32	9,1±1,8	9,0±1,3	32	5,5±0,2	6,1±0,8
Día	h*[h]		Día	AT[e]	
0	66,6±3,4	66,6±3,4	0	4,9±0,1	4,9±0,1
8	71,4±5,0	69,0±6,2	8	5,3±0,1a	4,1±0,2b
16	72,5±4,7	74,3±5,5	16	5,3±0,3a	4,0±0,6b
24	70,5±4,0	64,3±13,9	24	4,4±0,4a	3,1±1,0b
32	66,8±4,5	73,4±9,7	32	4,9±0,2a	3,0±0,2b
Día	% PP[c]		Día	Sólidos solubles	
0	0,0±0,0	0,0±0,0	0	12,6±0,2	12,6±0,2
8	1,9±1,5	0,5±0,4	8	12,9±0,7	12,2±0,5
16	1,2±0,4	2,4±1,5	16	13,4±0,7	12,8±1,4
24	0,9±1,1	1,2±0,6	24	12,6±0,3	11,6±0,9
32	0,9±0,8	1,6±1,7	32	12,5±0,4a	11,0±0,6b

a-b letras diferentes significa que existen diferencias significativas basadas en la prueba Tukey ($p<0,05$) en una misma fila. n=4.
c=% Pérdida de peso
d=KgF
e=Acidez Titulable meq de Acido Cítrico/g material vegetal
f=Luminocidad
g= Chroma
h=Hue

Figura 2-2. Gráfica de intervalos para las coordenadas de color L, c*, h* obtenidas a lo largo del tiempo para los frutos almacenados a 4°C y 20°C.



La Figura 2-3 ilustra los resultados para las medidas de pH, en la cual se observa que dicho parámetro aumenta con el tiempo para los frutos almacenados tanto a 4°C como a 20°C; adicionalmente, se observa que durante todo el experimento el pH es significativamente mayor (La Tabla 2-1 muestra los resultados para las medidas de caracterización fisicoquímica realizadas sobre las unidades experimentales almacenadas a 4°C y 20°C y evaluadas cada 8 días. En esta tabla se señalan los casos en los cuales se presentaron diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p<0,05$) entre unidades experimentales sometidas a las dos temperaturas de estudio en un mismo día. El análisis estadístico se llevó a cabo en el paquete R.

Según estos resultados la AT, el pH y los sólidos solubles expresados como °Brix son buenos indicadores de los cambios sufridos por el fruto durante el ensayo de almacenamiento a dos temperaturas, puesto que son aquellos los que presentan diferencias significativas entre tratamientos, sobre todo para las dos últimas semanas del experimento.

La

	Temperatura de almacenamiento				
	4°C	**20°C**		**4°C**	**20°C**
Día	L[f]		Día	pH	
0	33,2±2,8	33,2±2,8	0	2,5±0,0	2,5±0,0
8	35,0±0,5	35,5±0,8	8	2,5±0,1	2,6±0,1
16	35,2±0,7	35,7±0,4	16	2,5±0,0	2,6±0,1
24	34,1±0,8	35,6±1,8	24	2,6±0,0a	2,8±0,1b

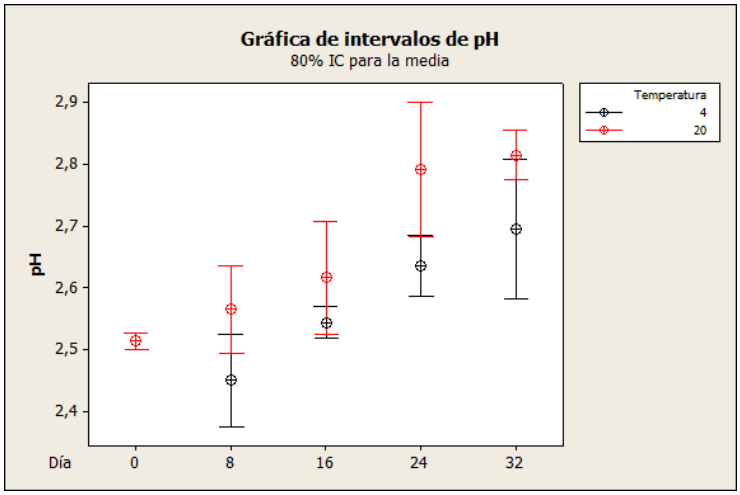
32	36,6±1,7	35,8±0,4	32	2,6±0,1a	2,8±0,1b
Día	c*[g]		Día	Firmeza[d]	
0	7,2±0,5	7,2±0,5	0	5,5±0,6	5,5±0,6
8	8,1±0,2a	7,2±0,4b	8	4,7±0,8	3,8±0,5
16	7,3±0,7	7,0±0,5	16	6,6±0,9	5,2±0,3
24	6,1±0,4	7,3±1,1	24	5,0±0,7	4,7±0,8
32	9,1±1,8	9,0±1,3	32	5,5±0,2	6,1±0,8
Día	h*[h]		Día	AT[e]	
0	66,6±3,4	66,6±3,4	0	4,9±0,1	4,9±0,1
8	71,4±5,0	69,0±6,2	8	5,3±0,1a	4,1±0,2b
16	72,5±4,7	74,3±5,5	16	5,3±0,3a	4,0±0,6b
24	70,5±4,0	64,3±13,9	24	4,4±0,4a	3,1±1,0b
32	66,8±4,5	73,4±9,7	32	4,9±0,2a	3,0±0,2b
Día	% PP[c]		Día	Sólidos solubles	
0	0,0±0,0	0,0±0,0	0	12,6±0,2	12,6±0,2
8	1,9±1,5	0,5±0,4	8	12,9±0,7	12,2±0,5
16	1,2±0,4	2,4±1,5	16	13,4±0,7	12,8±1,4
24	0,9±1,1	1,2±0,6	24	12,6±0,3	11,6±0,9
32	0,9±0,8	1,6±1,7	32	12,5±0,4a	11,0±0,6b

a-b letras diferentes significa que existen diferencias significativas basadas en la prueba Tukey ($p<0,05$) en una misma fila. n=4.
c=% Pérdida de peso
d=KgF
e=Acidez Titulable meq de Acido Cítrico/g material vegetal
f=Luminocidad
g= Chroma
h=Hue

Figura 2-2 ilustra los resultados obtenidos para los cambios en las coordenadas de color. Para la evaluación del color existen diferentes “espacios” expresados en coordenadas, para sistemas informáticos el más común es el espacio Lab; sin embargo, su interpretación manual puede ser complicada debido a la posibilidad de valores negativos, por lo cual comúnmente dichas coordenadas son transformadas al espacio LCh. En el espacio LCh, la coordenada L se refiere a la luminosidad, se expresa en valores de 0 a 100. El valor C (Chroma) indica la saturación del color, expresado en valores de 0 a 100, de manera que a menores valores se acerca al eje de los grises. Por último el parámetro h (Hue) indica el tono, se expresa en grados, de 0° a 360°, y su aumento se da en un movimiento contrario a las agujas del reloj [81, 82]. Los resultados muestran que no existen diferencias significativas para las coordenadas L y h debidas a las dos temperaturas de almacenamiento, y solo se encontró diferencias en la coordenada c para el día 8; sin embargo, ya que no se observa una tendencia para dicha coordenada puede creerse que la diferencia es debida a una heterogeneidad de los frutos.

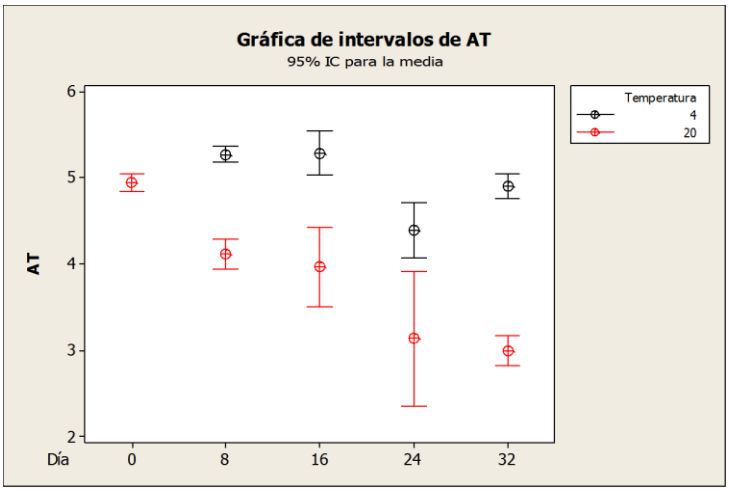
Tabla 2-1) para los frutos almacenados a 20°C.

Figura 2-3. Gráfica de intervalos para las mediciones de pH a lo largo del tiempo para los frutos almacenados a 4°C y 20°C



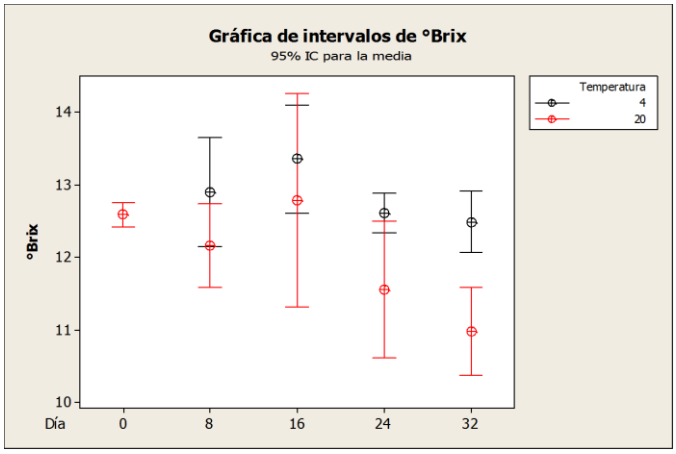
La **¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.** ilustra los resultados para las medidas de acidez total titulable, en la que se observa que la acidez disminuye con el tiempo durante el experimento, y que por otra parte los frutos almacenados a 4°C presentan mayor acidez que aquellos almacenados a 20°C.

Figura 2-4. Gráfica de intervalos para las mediciones de Acidez Total Titulable a lo largo del tiempo para los frutos almacenados a 4°C y 20°C.



La Figura 2-5 ilustra los resultados para las medidas de sólidos solubles expresados como °Brix, en donde se observa que los sólidos solubles disminuyen con el tiempo para los frutos almacenados a 20°C, y que son significativamente distintos entre las dos temperaturas de almacenamiento después del día 24.

Figura 2-5. Gráfica de intervalos para las mediciones de sólidos solubles expresados como °Brix a lo largo del tiempo para los frutos almacenados a 4°C y 20°C.



Los datos recolectados para la firmeza del fruto, y el porcentaje de pérdida de peso de las unidades experimentales no presentaron cambios significativos ni en el tiempo ni entre tratamientos, lo cual concuerda con los datos de experimentos previos de almacenamiento de frutos de gulupa en el empaque Makropol M, siendo una ventaja para su exportación [83].

En resumen, encontramos que los sólidos solubles expresados como °Brix se mantienen constantes para los frutos sometidos a almacenamiento a 4°C, mientras que en los frutos almacenados a 20°C disminuye con el tiempo. Por otra parte, la AT es menor para los frutos almacenados a 20°C que para los frutos almacenados a 4°C durante todo el experimento. Por último se encuentra que el pH aumenta en el tiempo para los frutos almacenados en las dos temperaturas; sin embargo, es mayor para los frutos almacenados a 20°C.

Los resultados obtenidos concuerdan con reportes previos sobre cambios en parámetros fisicoquímicos en la gulupa, Matta, F. et al. [84] reportaron que para frutos almacenados a 15°C se presentó una disminución en los sólidos solubles con respecto al tiempo de almacenamiento, mientras que aquellos frutos almacenados a 5°C y 10°C, no presentaron cambios en dicho parámetro. Por otra parte, Melgarejo, L. et al. [83] reportaron un aumento en el pH para frutos almacenados en empaques como el usado en el presente experimento a temperatura ambiente, dicho aumento en el pH es asociado a la disminución de los ácidos orgánicos como resultado de procesos metabólicos del fruto.

Por su parte Díaz, et al [85] realizaron un experimento de almacenamiento de de gulupa, utilizando frutos al 50%, 70% y 100% de maduración en bolsas tipo Xtend® a 4°C y 10°C utilizando como control frutos almacenados a 20°C sin empaque. Reportaron una pérdida de peso considerable para los frutos almacenados a 4°C, y una evolución considerable del color a lo largo del experimento, contrario a los resultados obtenidos en el presente documento con el empaque Makropol M, lo cual indica que dicho empaque es efectivo para retardar el proceso de maduración del fruto, así como las pérdidas de peso por deshidratación, hecho previamente reportado por Melgarejo, L [83]. Al igual que en el presente experimento, Díaz, et al [85] reporta que los sólidos solubles se mantienen constantes para los frutos almacenados a 4°C y disminuyen para aquellos almacenados a 20°C.

Los datos recolectados permiten establecer que sí existen diferencias significativas para los frutos almacenados a distintas temperaturas, específicamente después de los días 24 y 32 de almacenamiento, por lo cual los frutos de dichas unidades experimentales son candidatos para el análisis mediante proteómica, con el fin de establecer qué proteínas se encuentran diferencialmente debido al tratamiento proporcionado.

3. Capítulo 3: SELECCIÓN DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DEL PROTEOMA DE GULUPA

3.1 Marco teórico

Debido a que el tejido de frutas contiene componentes como fenoles, pectinas, compuestos ácidos y proteasas existe una dificultad en la extracción del proteoma para dichos tejidos [28]. En general, los métodos de extracción incluyen el uso de buffer con SDS, la extracción con fenol y la precipitación con ácido tricloroacético (TCA); sin embargo, cada matriz requiere un estudio previo de la metodología de extracción del proteoma de manera que tenga en cuenta los objetivos a alcanzar.

Uno de los métodos de extracción de proteínas más usado en tejidos vegetales utiliza dos fases (fenol/buffer Tris-HCl), formando un sistema en el cual la extracción se hace por un proceso de partición y las proteínas son recuperadas de la fase orgánica. Este método es reportado en múltiples estudios del proteoma en frutas y tejidos vegetales debido a que presenta ciertas ventajas sobre otros: El fenol presente en el buffer de extracción rompe los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas y reduce la proteólisis lo que permite una extracción eficiente de proteínas; además, permite la separación de interferentes para el isoelectroenfoque como son los ácidos nucleicos y carbohidratos. En muchos casos se reporta la adición de PMSF al buffer de lisis para inhibir la actividad de las proteasas, lo que mejora el rendimiento y el enfoque en la electroforesis bidimensional [29]. Sin embargo, este método presenta el inconveniente del uso de grandes cantidades de fenol, un reactivo altamente tóxico.

Otro método de extracción y purificación de proteínas es el método de precipitación con TCA, el cual ha sido ampliamente aplicado en una variedad de tejidos; sin embargo, en la mayoría de los casos las proteínas precipitadas presentan problemas para ser re-disueltas [28]. La precipitación inducida por TCA es independiente del tamaño y la

naturaleza de las proteínas y su capacidad de precipitación depende tanto de la acidez del TCA como del hecho que a bajas concentraciones los iones tricloroacetato con carga negativa pueden desplegar la proteína mediante la interrupción de las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria de las proteínas. El despliegue parcial de proteínas resulta en la exposición de una superficie no-polar ahora accesible al solvente, y que en consecuencia resulta en coalescencia intermolecular de moléculas de proteínas que llevan a su precipitación [31].

En el año 2006, Wang et al [86], reportaron un método de precipitación directa aplicado exitosamente en pino, tabaco, limón, oliva, caña de azúcar y otros. El método consiste en lavados sucesivos sobre el tejido con TCA en acetona, acetato de amonio en metanol, y acetona, y la extracción de la proteína se hace en un buffer tris-HCl saturado con fenol; después de separar la fase orgánica en la cual se encuentran solubles las proteínas, se hace una precipitación con acetato de amonio en metanol y el pellet es rehidratado en el buffer de O'farrell [87].

En el presente texto se presentan los resultados para la evaluación de tres metodologías de extracción del proteoma de gulupa. La selección del método adecuado se realizó teniendo en cuenta la cantidad de proteína extraída y los perfiles electroforéticos unidimensionales. Por último, se presentan los resultados obtenidos y las electroforesis unidimensionales de muestras de la pulpa de gulupa extraída de los frutos almacenados a 4°C y 20°C.

3.2 Metodología

3.2.1 Metodologías de extracción de proteoma

Para realizar los ensayos de selección de la metodología de extracción se seleccionaron frutos del 75% (según el color de la cáscara y días después de antesis), se separó la pulpa de las semillas; el jugo obtenido se congeló a -80ºC y posteriormente se liofilizó. Para todas las metodologías de extracción se realizaron cuatro réplicas sobre aproximadamente 0,15 g de pulpa liofilizada.

- Método 1: Extracción en buffer Tris-HCl/SDS y precipitación con ácido tricloroacético TCA [29, 36]:

Se pesó en balanza analítica aproximadamente 0,15g de pulpa liofilizada, sobre la cual se adicionó 1,0 mL de buffer Tris-HCl 40mM pH 8,5, SDS 2%, DTT 60mM. Dicha mezcla se agitó por 30min a 4ºC, después de lo cual se centrifugó a 10000rpm y 4°C durante 20 minutos. Se separó en un tubo nuevo el sobrenadante y se adicionó 1,0 mL de TCA al 10% en acetona fría. Se permitió la precipitación de las proteínas durante toda la noche a -20 °C, después de lo cual se centrifugó a 10000 rpm y 4°C durante 10 minutos, el pellet fue lavado con acetona al 80% y redisuelto en una solución con úrea 7,0 M, tioúrea 2,0 M, DTT 50,0 mM, CHAPS 3%.

- Métodos 2: Extracción con buffer Tris-HCl saturado con fenol y precipitación con acetato de amonio [35, 36]:

Se pesó en balanza analítica aproximadamente 0,15g de pulpa liofilizada sobre la cual se adicionó 1,0 mL de buffer Tris-HCl 100mM pH 8,8, SDS 2%, Sacarosa 30%, DTT 10mM, se agitó por 30 min a 4ºC, se centrifugó a 10000rpm y 4°C durante 20 minutos. En un tubo nuevo se separó el sobrenadante al cual se adicionó 1,0 mL de buffer Tris-HCl 10mM pH 8,8 saturado con fenol. Se agitó por 30 segundos, se centrifugó a 10000rpm y 4°C durante 20 minutos, se observó la separación de dos fases y las dos se recuperaron. La fase inferior se rotuló como Método 2.1, y la fase superior como Método 2.2. Sobre estos sobrenadantes se adicionó 1,0 mL de acetato de amonio 0,1 M en metanol frío. Se permitió la precipitación de las proteínas durante toda la noche, se centrifugó a 10000rpm y 4°C durante 10 minutos, el pellet fue lavado con acetona al 80% y redisuelto en una solución con úrea 7,0 M, tioúrea 2,0 M, DTT 50,0 mM, CHAPS 3%.

- Método 3: Precipitación directa con TCA y acetato de amonio en metanol, seguida de extracción con buffer Tris-HCl saturado con fenol y precipitación con acetato de amonio [86]:

Se pesó en balanza analítica aproximadamente 0,15 g de pulpa liofilizada sobre la cual se adicionó 1,0 mL de TCA 10% en acetona fría, se agitó 1 minuto en vortex, se centrifugó a 10000rpm y 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó, y sobre el pellet se adicionó 1,0 mL de Acetato de amonio 0,1 M en metanol frío, se agitó 1 minuto

en vortex, se centrifugó a 10000rpm y 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y sobre el pellet se adicionó 1,0 mL de acetona al 80% fría, se agitó 1 minuto en vortex, se centrifugó a 10000rpm y 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y sobre el pellet se adicionaron 750 µL de buffer Tris-HCl 100mM pH 8,8, SDS 2%, Sacarosa 30%, DTT 10mM, se agitó por 30 segundos en vortex, y se adicionaron 750 µL de buffer Tris-HCl 10mM pH 8,8 saturado con fenol, se agitó por 30 segundos en vortex y por 10 minutos en agitador horizontal. Se centrifugó a 10000rpm y 4°C durante 20 minutos, se observó la separación de dos fases y las dos se recuperaron. La fase inferior se rotuló como Método 3.1, y la fase superior como Método 3.2. Sobre estos sobrenadantes se adicionó 1,0 mL de acetato de amonio 0,1 M en metanol frío. Se permitió la precipitación de las proteínas durante toda la noche, se centrifugó a 10000rpm y 4°C durante 10 minutos, el pellet fue lavado con acetona al 80% y redisuelto en una solución con úrea 7,0 M, tioúrea 2,0 M, DTT 50,0 mM, CHAPS 3%.

3.3 Evaluación de las metodologías de extracción

3.3.1 Contenido de proteína

La determinación del contenido de proteína se hizo por el método de Bradford, usando el Kit BIO RAD Protein Assay según las instrucciones del manual para la micro-determinación. La lectura de absorbancia a 595 nm se realizó en un lector de microplaca iMark Microplate Absorbance Reader de BIO RAD [88].

3.3.2 Electroforesis SDS-PAGE

La SDS-PAGE se realizó en geles de separación T12%, usando geles de concentración T4% según el protocolo de Laemmli [38] (Tabla 3-1), en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell de BIO RAD. En todos los casos se sembraron 25 µg de proteína por pozo. En el pozo central se sembraron 2 µL de un patrón de peso molecular de rango amplio (200,0 a 6,4 KDa) BIO RAD. La electroforesis se corrió a 80V durante 2 horas usando como solución tampón de tanque 0.025 M Tris-HCl, 0.192 M Glicina, 0.1% SDS, pH 8.3..

Tabla 3-1. Preparación de geles de poliacrilamida.

Reactivo	Gel Concentración T4%	Unidades	Gel separación T12%	Unidades
Acrilamida	1,29	mL	19,99	mL
Agua destilada	6,06	mL	16,74	mL
Tris HCl 1.5M pH 8.8	-	-	12,49	mL
Tris HCl 0.5M pH 6.8	2,49	mL	-	-
SDS1% (p/v)	0,10	ml	0,50	mL
Persulfato de amonio	49,70	ul	249,88	ul
Temed 10% (p/v)	9,94	uL	24,99	uL
Volumen Final	**10**	**mL**	**50**	**mL**

3.3.3 Tinción

La tinción se llevó a cabo usando Coomassie coloidal G-250 de acuerdo al protocolo propuesto por Dyballa et al [89], el cual consiste en tres lavados del gel con agua tipo I durante 10 min, seguidos de la adición del tinte Coomassie coloidal G-250 preparado según se muestra en la **¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.**. El gel junto con el tinte se llevó a un agitador horizontal, a baja velocidad, durante toda la noche, después de lo cual se retiró la solución y se lavó el gel con agua tipo I hasta eliminar las partículas suspendidas del recipiente. Se adicionó la solución de desteñido, preparada de acuerdo con la **¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.**, y se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, los geles se lavaron con agua tipo I y se almacenaron hasta su procesamiento.

Tabla 3-2. Reactivos para tinción de geles con Coomassie coloidal G-250 de acuerdo al protocolo propuesto por Dyballa et al [89]

Solución de tinción	
Reactivo	**Reactivo**
Sulfato aluminio	0.5% (p/v)
Etanol	2.0% (v/v)
CBB	0.02% (p/v)
Ácido fosfórico (85%)	2.0 % (v/v)
Solución de desteñido	
Reactivo	Reactivo
Etanol	10% (v/v)

Ácido Fosfórico	2% (v/v)

3.3.4 Análisis de imágenes obtenidas de los geles de electroforesis

Los geles fueron digitalizados con un scanner UMAX PowerLook 2100XL-USB. El análisis de imágenes para geles unidimensionales se llevó a cabo con el software Quantity One® Versión 4.6.3 (Bio Rad, Hercules, USA) el cual permite procesar imágenes obtenidas de geles unidimensionales, identificar las bandas encontradas para cada carril y por comparación con patrones asignar un peso molecular a cada banda.

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Selección de la metodología de extracción

Con el fin de seleccionar la metodología de extracción del proteoma para la pulpa se evaluó el contenido de proteína extraído por cada método, y el número de bandas encontradas en la electroforesis SDS-PAGE. La electroforesis se hizo solo para los extractos con suficiente contenido de proteína, para sembrar 25 µg de proteína por pozo, es decir los métodos 1, 2 y 3. La Figura 3-1, la Figura 3-2 y la Figura 3-3 muestran las imágenes procesadas de los geles obtenidos por electroforesis unidimensional de los métodos 1, 2 y 3, cada carril es una réplica del correspondiente método de extracción.

Figura 3-1. Electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos mediante el método 1.

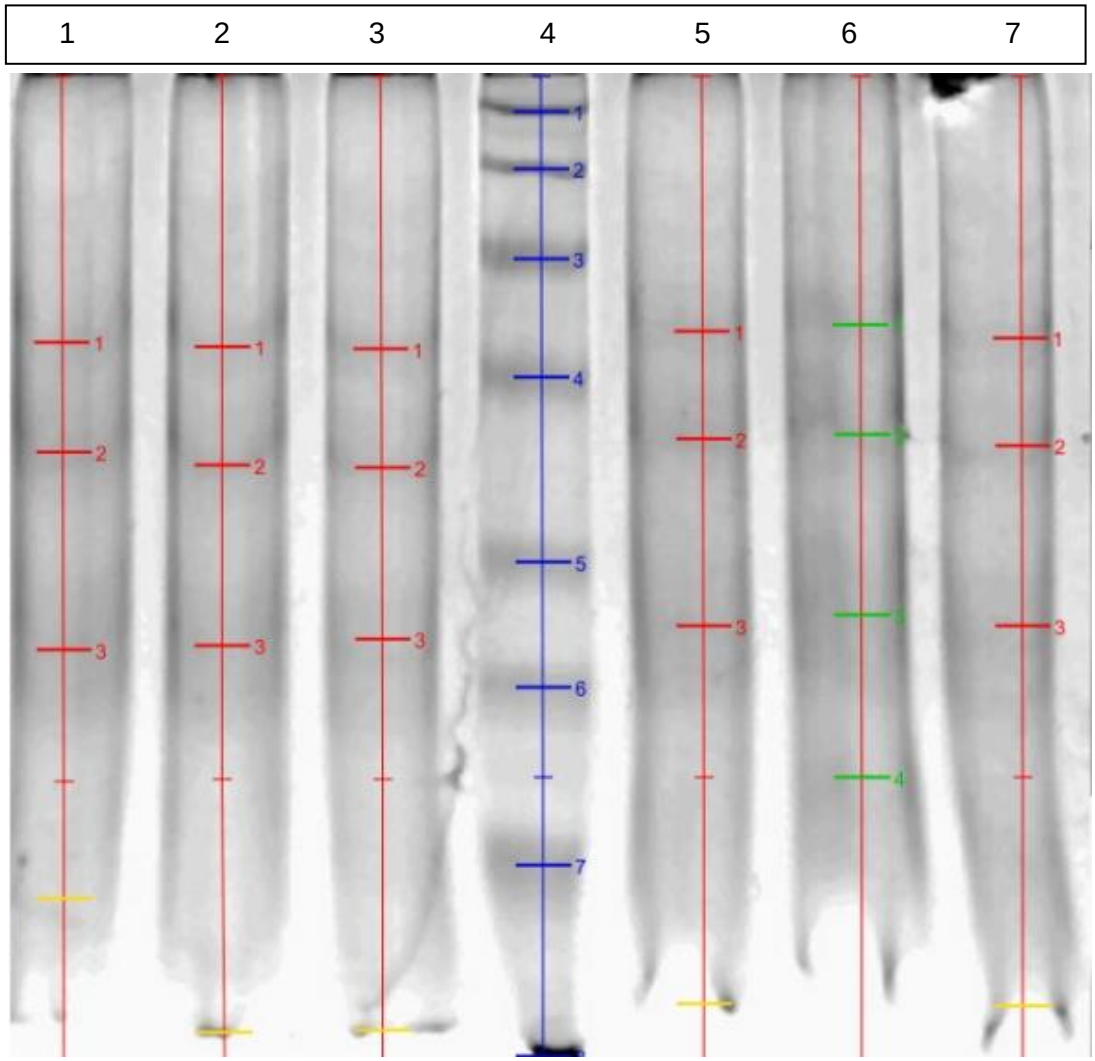


Tabla 3-3. Bandas para la electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos mediante el método 1.

Carril	1	2	3	4	5	6	7
ug de Proteína	25	25	25	PM*	25	25	25
N° de bandas	4	4	4	7	4	4	4

*PM Patrón de pesos moleculares.

Figura 3-2. Electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos mediante el método 2.1.

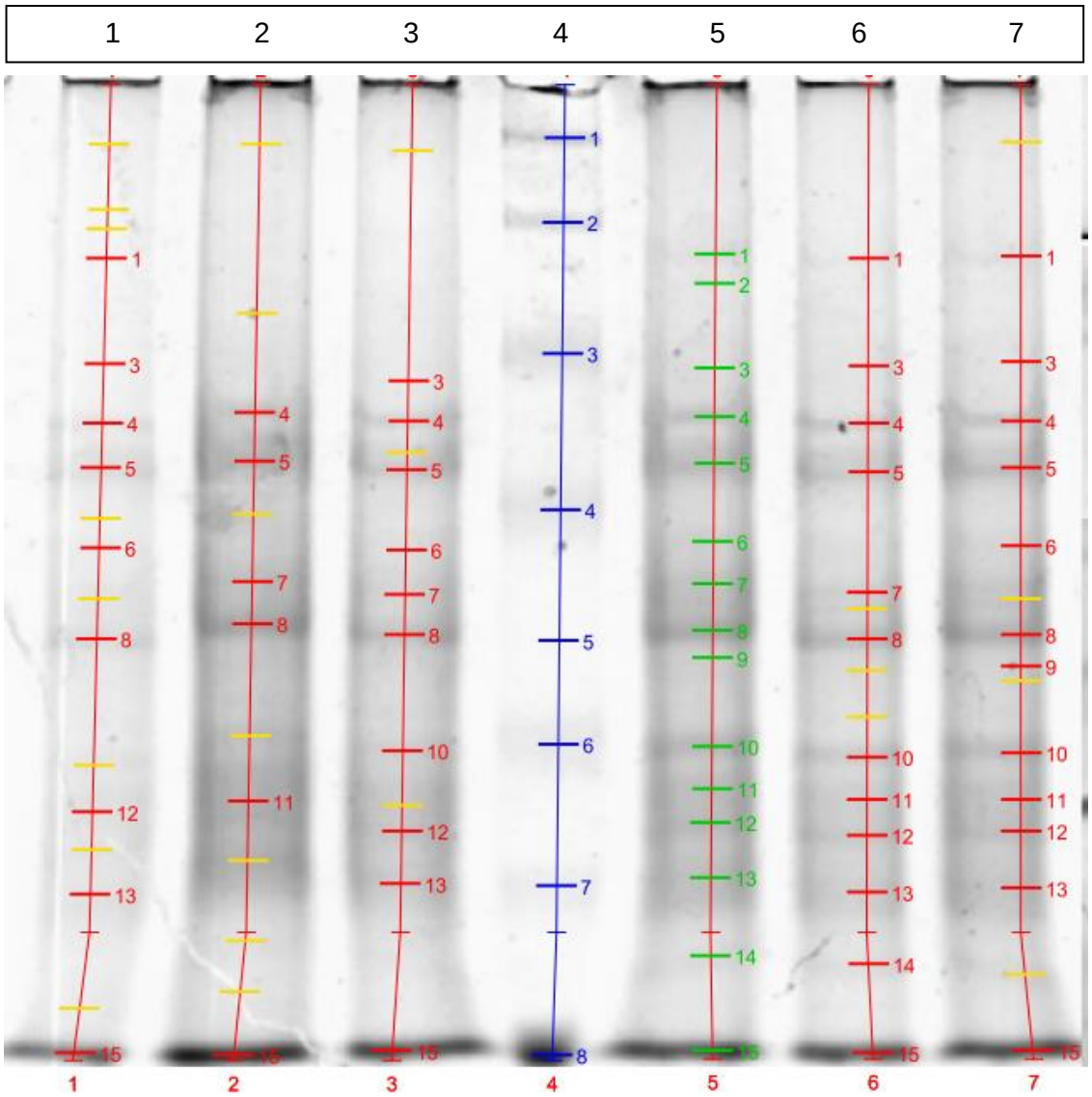


Tabla 3-4. Bandas para la electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos mediante el método 2.1.

Carril	1	2	3	4	5	6	7
ug de Proteína	25	25	25	PM*	25	25	25

N° de bandas	17	13	13	7	15	15	16

*PM Patrón de pesos moleculares.

Figura 3-3. Electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos mediante el método 3.1.

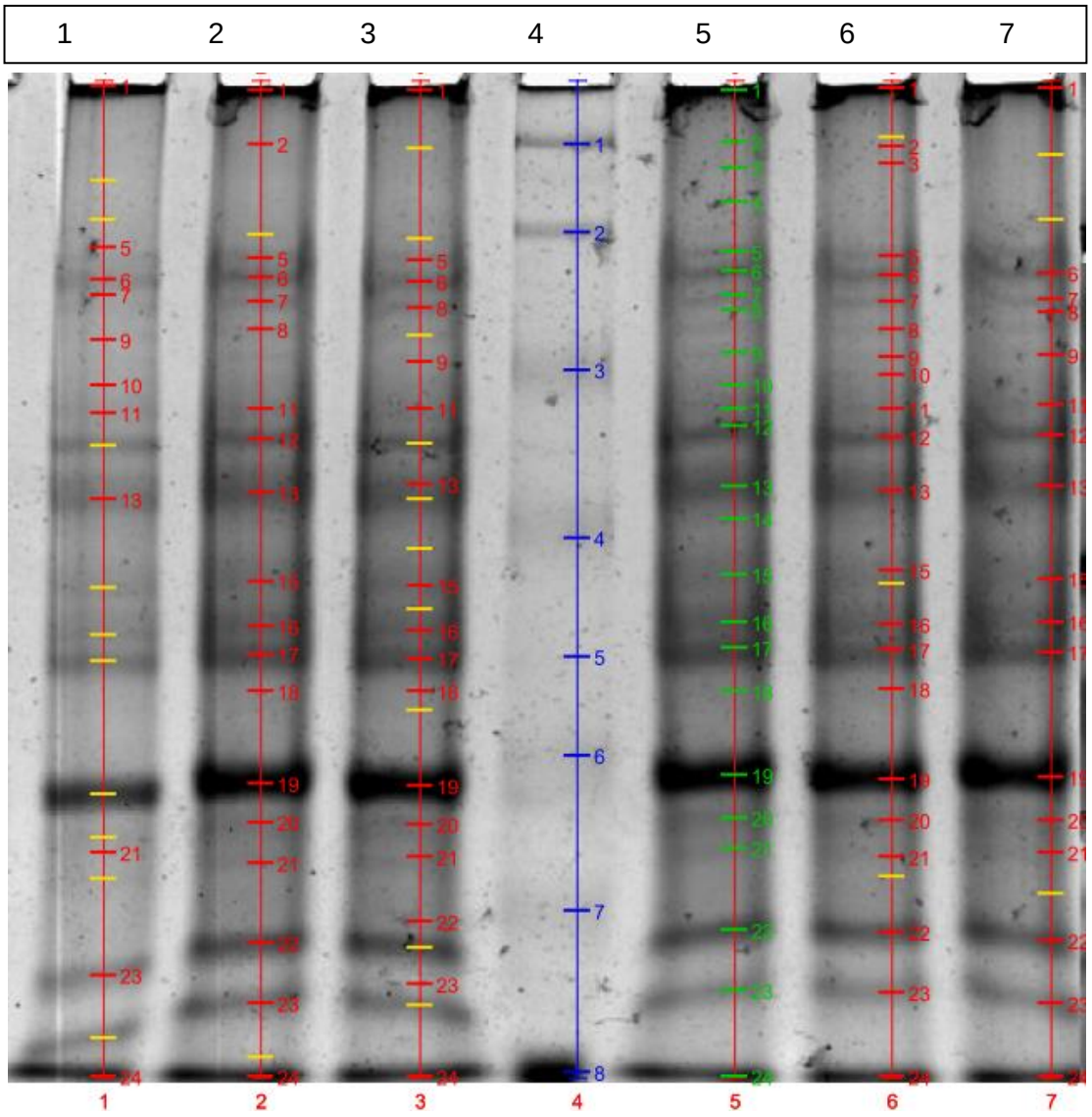


Tabla 3-5. Bandas para la electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos mediante el método 3.1.

Carril	1	2	3	4	5	6	7
ug de Proteína	25	25	25	PM*	25	25	25

N° de bandas	21	21	27	7	24	25	20

*PM Patrón de pesos moleculares.

Se hizo un análisis de varianza (p<0,05) en cada caso, para determinar las diferencias significativas entre los contenidos de proteína y el número de bandas encontrado para los distintitos métodos de extracción, la Tabla 3-6 resume dichos resultados.

Tabla 3-6. Contenido de proteína y número de bandas encontradas en la electroforesis unidimensional para las metodologías de extracción de la proteína de gulupa evaluadas.

	Contenido de Proteína*	**N° Bandas en la electroforesis unidimensional****
Método 1 (Zheng, et al. 2007 [36])	3,36±0,31a	3±2,5[a]
Método 2.1 (Ramu, et al. 2004 [35])	0,37±0,08b	-
Método 2.2 (Ramu, et al.2004[35])	0,23±0,03b	-
Método 3.1 (Wang, et al. 2006[86])	6,37±0,47c	14±0,9b
Método 3.2 (Wang, et al. 2006[86])	6,58±2,38c	18±0,6c

*mg Proteína/g de material vegetal inicial. n=4
**n=4
a-c, letras distintas identifican diferencias significativas basadas en la prueba Tukey (p<0,05) en una misma columna.

La metodología 2, de Ramu et al. [35], que consistió en una extracción en buffer/fenol del cual se obtienen dos fases, sobre las cuales se adicionó el agente precipitación (acetato de amonio en metanol) extrajo en las dos fases obtenidas, una cantidad mínima de proteína, que fue insuficiente para realizar una electroforesis unidimensional. El principal inconveniente encontrado durante el procesamiento de muestras con esta metodología, consistió en la formación de un de gel durante la precipitación, probablemente de pectinas, el cual ocluyó las proteínas impidiendo su disolución en el buffer.

La metodología 1 que comprende la extracción en un buffer y posterior precipitación de las proteínas usando como agente precipitante TCA en acetona, y la posterior solubilización del precipitado en el buffer para isoelectroenfoque, cabe señalar que a pesar de que se obtuvo una cantidad importante de proteína en solución, no se observó la completa disolución del precipitado. Sin embargo, en el perfil de electroforesis unidimensional se encontraron muy pocas bandas (3), de forma que, al parecer, dicha

metodología solo extrae unas pocas proteínas en una buena cantidad. Puesto que el objetivo es seleccionar una metodología que extraiga de manera eficiente una gran variedad de proteínas, esta metodología no se consideró adecuada para la obtención del proteoma de la gulupa.

Por último, la metodología 3, que consiste de una precipitación directa con TCA en acetona, una precipitación directa con acetato de amonio en metanol, una extracción en un buffer con fenol, de manera que se forman dos fases, sobre las cuales se realiza una precipitación con acetato de amonio, y la posterior solubilización del precipitado en el buffer para isoelectroenfoque, de manera que se obtuvieron extractos translucidos y ligeramente viscosos, con altas concentraciones de proteína para las dos fases recuperadas, y perfiles electroforéticos con buen número de bandas (18), por lo cual se seleccionó esta metodología para la extracción del proteoma de gulupa.

Puesto que la fase fenólica (superior) presentó un mayor número de bandas, y que según lo reportado, contiene un menor número de moléculas interferentes frente a la electroforesis bidimensional, se seleccionó para la obtención del proteoma de gulupa en los análisis posteriores.

4. Capítulo 4: ANÁLISIS DE APROXIMACIÓN PROTEÓMICA PARA LOS CAMBIOS EN EL PROTEOMA DE GULUPA DEBIDOS AL ALMACENAMIENTO A DOS TEMPERATURAS DURANTE LA POSCOSECHA

4.1 Metodología

4.1.1 Extracción del proteoma de gulupa para frutos almacenados a 20°C y a 4°C

Una vez realizados los tratamientos descritos en el diseño experimental (La unidad experimental consistió de un grupo de tres frutos almacenados en bolsas Makropol M cada una de las cuales fue marcada con un número del 1 al 27, y su conjunto fue pesado para la determinación del porcentaje de pérdida de peso en el experimento.

Figura 2-1), se realizó la extracción del proteoma de las muestras de gulupa (tres réplicas por unidad experimental), las cuales fueron previamente liofilizadas. La metodología de extracción corresponde a la número 3 (Wang, et al. 2006; Ver numeral 3.2.1).

4.1.2 Determinación del contenido de proteína para frutos almacenados a 20°C y a 4°C

La determinación del contenido de proteína se realizó por triplicado para cada extracto obtenido por cada unidad experimental, de manera que se tienen tres réplicas biológicas por temperatura de almacenamiento (unidad experimental) y tres réplicas técnicas de la determinación para cada réplica biológica. La metodología usada corresponde al método de Bradford, usando el Kit BIO RAD Protein Assay siguiendo las instrucciones del manual

para la micro-determinación. La lectura de absorbancia a 595 nm se realizó en un lector de microplaca iMark Microplate Absorbance Reader de BIO RAD [88].

4.1.3 Electroforesis unidimensional de los extractos de proteína obtenidos de frutos almacenados a 20°C y a 4°C

La SDS-PAGE se realizó en geles de poliacrilamida T12%, usando geles de concentración T4% según el protocolo de Laemmli [38] (Ver Tabla 3-1), empleando para este fin una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell de BIO RAD, en todos los casos se sembraron 25 µg de proteína por pozo. En el pozo central se sembraron 2 µL de un patrón de peso molecular de rango amplio (200,0 a 6,4 KDa) BIO RAD. La electroforesis se corrió a 80V durante 2 horas usando como solución tampón de tanque 0.025 M Tris-HCl, 0.192 M Glycin, 0.1% SDS, pH 8.3.

En cada gel se sembraron los extractos de las unidades experimentales correspondientes al mismo día de muestreo en las dos temperaturas de almacenamiento, es decir tres carriles para extractos de frutos almacenados a 4°C y tres carriles para extractos de frutos almacenados a 20°C, con el objetivo de analizar las diferencias en los perfiles electroforéticos unidimensionales debidos al tratamiento de almacenamiento a diferentes temperaturas, y seleccionar el día adecuado para la comparación mediante electroforesis bidimensional.

4.1.4 Electroforesis bidimensional para los extractos seleccionados de frutos almacenados a 20°C y a 4°C

La electroforesis bidimensional se realizó para los extractos proteicos seleccionados, tal como se describe posteriormente en el numeral 4.2.1; es decir, los extractos obtenidos de frutos almacenados por 32 días, de cada réplica obtenida en la extracción se obtuvieron dos geles, de manera que 6 geles corresponden a frutos almacenados a 4° y 6 geles a frutos almacenados a 20°C.

En primer lugar, se llevó a cabo el proceso de rehidratación de la tira IPG Ready Strip® de BIO RAD de 18 cm con un gradiente de pH inmovilizado de 3 a 10, para lo cual se tomó la cantidad de extracto necesaria para contener 400 µg de proteína, y se completó un volumen de 300 µL con el buffer de rehidratación (úrea 7,0 M, tioúrea 2,0 M, DTT 50,0 mM, CHAPS 3%), adicionando unos cristales de azul de bromofenol. Dicha solución

se llevó a la bandeja de isoelectroenfoque y sobre la misma se colocó la tira de IPG, la cual se cubrió con aceite mineral. La rehidratación de la tira se llevó a cabo durante 16 horas a 50V en un equipo PROTEAN® IEF cell de BIO RAD, después de la cual se inició el proceso de isoelectroenfoque de acuerdo al protocolo de la Tabla 4-1.

Tabla 4-1. Protocolo de isoelectroenfoque para extractos proteicos de pulpa de gulupa.

Etapa	Voltaje (V)	Rampa	Tiempo (h)
1	500	Rápida	1
2	2000	Rápida	1
3	4000	Rápida	2
4	4000 a 10000	Lineal	1
5	10000	constante	4
6	4000	Rápida	2
7	500	Rápida	2

Una vez realizado el isoelectroenfoque se procedió a equilibrar las tiras IPG para lo cual se llevaron las tiras a una bandeja de rehidratación, sobre cada tira se adicionó1,0mL del buffer de equilibrio en condiciones reductoras (Urea 6 M, glicerol 30% p/v, SDS 2% p/v, Tris-HCl 0.05M pH 8.6 y DTT 65mM) y se agitó suavemente durante 15 minutos. Terminado este tiempo se transfirió la tira a una nueva bandeja de rehidratación y se adicionó1,0mL del buffer de equilibrio por tira en condiciones alquilantes (Urea 6 M, glicerol 30% p/v, SDS 2% p/v, Tris-HCl 0.05 M pH 8,6 y iodoacetamida135 mM), y se agitó suavemente durante 15 minutos. Terminado este tiempo, se desechó el buffer de equilibrio se sumergió la tira durante 15 segundos en buffer de corrido de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3).

La segunda dimensión se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante en un equipo PROTEAN® Plus Dodeca Cell con geles de poliacrilamida de T12% de 20 x 20 cm preparado según las instrucciones de la Tabla 3-1. Se utilizaron 10 µL de un patrón de peso molecular de rango amplio (200,0 a 6,4 kDa) de BIORAD. La electroforesis se corrió a 100V durante 2 horas y 200V durante 7 horas usando como solución tampón de tanque 0.025 M Tris-HCl, 0.192 M Glycin, 0.1% SDS, pH 8.3..

4.1.5 Tinción de geles

La tinción se llevó a cabo usando Coomassie coloidal G-250 de acuerdo al protocolo propuesto por Dyballa et al [89], como se indicó en el aparte 3.3.3 del presente documento.

4.1.6 Análisis de imágenes de electroforesis unidimensionales

Los geles fueron digitalizados con un scanner UMAX PowerLook 2100XL-USB como se indicó en el aparte 3.3.4. Adicionalmente, se utilizó la herramienta Match, que permite comparar la similaridad de las bandas detectadas entre carriles teniendo en cuenta su peso molecular y los posibles defectos del gel, de manera que permite determinar la aparición de bandas diferenciales entre los extractos obtenidos de frutos almacenados a 4°C y 20°C.

4.1.7 Análisis de imágenes de electroforesis bidimensionales

Los geles fueron digitalizados con un scanner UMAX PowerLook 2100XL-USB. El análisis de imágenes para geles bidimensionales se llevó a cabo con el software PDQuest 8.0.1 (Bio Rad, Hercules, USA). Para el procesamiento de las imágenes el primer paso consistió en cortar las imágenes digitalizadas para que tengan un mismo tamaño, después de lo cual se utilizó el filtro “sal y pimienta” gaussiana de 3 x 3 (pixeles), con el fin de minimizar el ruido de fondo en los geles. Una vez transformadas las imágenes, se generaron grupos de acuerdo a los dos tratamientos en estudio (frutos a 4°C y a 20°C), y se procedió a la detección automática de las manchas en el gel ajustando los parámetros solicitados por el software; es decir, la indicación de una mancha grande, una pequeña y una tenue, después de lo cual se genera un “master gel” que comprende todas la manchas encontradas en los geles. Una vez detectadas las manchas con la herramienta automática, es posible adicionar o eliminar manchas del “master gel” de acuerdo al criterio del experimentador. Por último, se hizo uso de la herramienta Match, para comparar las manchas entre geles, teniendo en cuenta sus posiciones relativas y el análisis densitométrico después de la normalización con el método “Modelo de Regresión Local”. La intensidad de la señal se calculó teniendo en cuenta el área y la intensidad de cada mancha normalizada, intensidad total en pixeles de cada mancha respecto a la intensidad total de todas las manchas presentes en el gel.

Las comparaciones se realizaron evaluando entre las réplicas de los geles la presencia/ausencia de manchas (>1.5) y diferencias en la intensidad. Para evaluar las diferencias en intensidad, se organizaron los datos densitométricos aportados por el software en una tabla comparativa. Previo a la realización de las pruebas de hipótesis de diferencia de medias fue necesario corroborar los supuestos propios de la prueba, para ello, en los casos en los que no se verificó el supuesto de normalidad (mediante la prueba de Shapiro – Wilk) se procedió a realizar las transformaciones para ajustar la distribución mediante el algoritmo de Box-Cox. Por último, se realizó la verificación de la igualdad de varianzas y dependiendo de ello se aplicó la prueba respectiva.

Ahora bien, la prueba de ShapiroWilk [90] es una de las pruebas de normalidad más potentes, en particular cuando se trata de muestras pequeñas, puesto que se centra en contrastar los momentos[2] de la distribución a contrastar y la normal teórica. Por otro lado, la familia de transformaciones de potencia Box Cox [91] permite ajustar los datos obtenidos a una distribución normal al maximizar su verosimilitud[3].

4.1.8 Análisis por espectrometría de Masas

Las manchas de interés seleccionadas después del análisis de imágenes fueron cortados automáticamente mediante el sistema Exquest spot cutter (Bio Rad, Hercules, USA) y enviadas a la unidad SCAI de la Universidad de Córdoba-España para la identificación de péptidos mediante MALDI-TOF.

Para el análisis por espectrometría de masas, las manchas seleccionadas y cortadas fueron desteñidas con bicarbonato de amonio 200mM en acetonitrilo al 40% incubando a una temperatura de 37 °C durante 30 minutos por duplicado.Posteriormente, se realizaron tres ciclos de deshidratación con acetonitrilo puro y rehidratación con bicarbonato de amonio 25 mM en acetonitrilo al 40%, y se permitió el secado a temperatura ambiente.

---

[2]Un momento es un concepto que engloba las diferentes estadísticas descriptivas de una serie de datos, así, el momento de primer orden es la media, mientras que el segundo momento de orden central es la varianza, el tercer momento en torno a la media es el coeficiente de asimetría.

[3] La implementación del algoritmo de Box-Cox se encuentra en el paquete MASS (versión 7.3-29) de R.

Los trozos de gel desteñidos fueron tratados con tripsina porcina modificada (grado secuenciación; promega, Madison, USA) a una concentración final de 12,5 ng en bicarbonato de amonio 25 mM, usando una estación de digestión ProGest (Genomic solutions, Michigan USA) a una temperatura de 37 °C durante toda la noche.

Los péptidos resultantes digeridos fueron extraídos del gel por incubación durante 15 minutos con 10 µL de ácido trifluoroacético al 1% a temperatura ambiente. Con el fin de eliminar las sales y otros contaminantes presentes,los péptidos fueron purificados usando la columna ZipTip 175µ C18 (Millipore Bedford, MA, USA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante, usando como eluyente ácido fórmico al 5%.

Los péptidos purificados fueron depositados en una placa de ionización/desorción laser asistida por matriz usando el método de gota seca (ProMS, Genomic Solutions, Michigan USA), y ácido α-hidroxicinámico a una concentración de 5 µg/µL en acetonitrilo al 70 % y ácido trifluoroacético al 0,1% como matriz [92].

Las muestras fueron analizadas en un 4700 Proteomics Analyzer MALDI–TOF/TOF Mass Spectrometer (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA), en el rango 800-4000 m/z, con un voltaje de aceleración de 20 kV, en modo reflectrón y con un retraso de extracción establecido en 120 ns. El espectro fue calibrado usando los picos de autólisis de la tripsina m/z=842.51 y m/z = 2211.10 como estándar interno. Los iones más abundantes fueron luego analizados por MS/MS.

4.1.9 Análisis bioinformático

La búsqueda de péptidos fue realizada usando el software GPS Explorer TM v 3.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sobre la base de datos de la NCBI usando el buscador MASCOT v 1.9 (Matrix Science Ltd., London; http://www.matrixscience.com). La búsqueda de datos se restringió al subreino taxonómico Viridiplantae. Un sitio de escisión perdido, 10 ppm de tolerancia en la masa para MS y 0,5 Da para datos de MS/MS, Carbamidometilación de cisteínas como modificación fija y oxidación de la metionina como modificación variable (Sghaier-Hammami et al 2012). El software arroja una lista de 10 posibles proteínas organizadas en forma priorizada de acuerdo a los puntajes más altos de la huella peptídica basados en el algoritmo de búsqueda MOWSE ($P < 0.05$) (Daresbury, UK), http://www.dl.ac.uk/SEQNET/mowse.html, y entre las cuales es más probable que se encuentre la proteína analizada. De la lista se seleccionó la

proteína más probable teniendo en cuenta los puntajes (mayores a 95%), y la cercanía entre los pesos moleculares y puntos isoeléctricos experimentales y los de las proteínas en la lista.

4.2 Resultados y Análisis

4.2.1 Electroforesis unidimensional de los extractos de proteína obtenidos de frutos almacenados a 20°C y a 4°C

La Figura 4-1, Figura 4-2, Figura 4-3 y Figura 4-4 muestran los geles obtenidos mediante la metodología propuesta, en todos los casos los tres carriles de la izquierda corresponden a extractos de frutos almacenados a 20°C y tres carriles de la derecha corresponden a extractos de frutos almacenados a 4°C.

El análisis comparativo mediante QuantityOne® se realizó para determinar la aparición/desaparición de bandas asociadas a cada tratamiento. Se tomó como parámetro de selección de una banda diferencial entre los dos tratamientos la aparición/desaparición de la misma banda en los tres carriles correspondientes al mismo tratamiento.

Para los días 8 y 16 solo se encontró una banda diferencial, en un peso molecular promedio de 107,5 y 101,8 KDa, respectivamente. Por otra parte, en el día 24 se encontraron dos bandas diferenciales de 121,3 y 56,7 KDa. Y por último, en el día 32 se encontraron tres bandas diferenciales de 133,2, 72,8 y 55,5 KDa.

De manera interesante se encuentra que en todos los casos la aparición de bandas diferenciales entre tratamientos se da para los extractos de frutos almacenados a 4°C, y que por otra parte el número de bandas detectadas en total aumenta con los días de almacenamiento para los extractos de frutos sometidos a los dos tratamientos de interés.

Puesto que; i) el mayor número de bandas diferenciales entre tratamientos se encontraron en el día 32, ii) con el tiempo aumentan el número de bandas para los dos tratamientos, iii) el análisis fisicoquímico demostró que existen diferencias significativas entre los dos tratamientos para los frutos almacenados durante los días 24 y 32, se decidió realizar el análisis por electroforesis bidimensional para los extractos de los frutos

almacenados durante 32 días, comparando los perfiles asociados a las dos temperaturas de almacenamiento.

Figura 4-1. Electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos de frutos de gulupa almacenados a 20°C (carriles 1, 2 y 3), y 4°C (carriles 5, 6 y 7) en el día 8 de almacenamiento. El carril 4 corresponde al patrón de pesos moleculares.

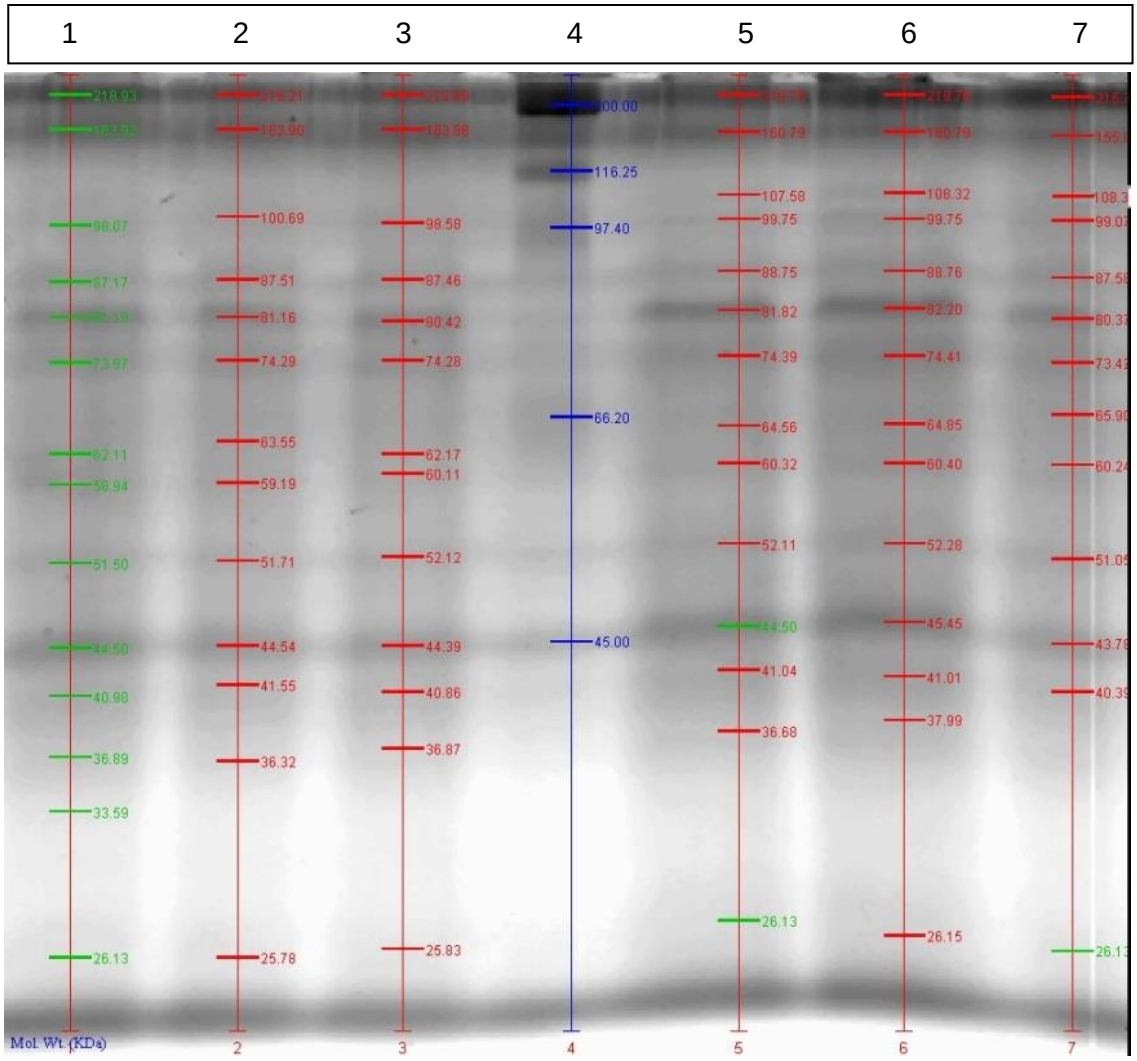


Tabla 4-2. Bandas para la electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos de frutos de gulupa almacenados a 20°C (carriles 1, 2 y 3), y 4°C (carriles 5, 6 y 7) en el día 8 de almacenamiento.

Carril	1	2	3	4	5	6	7
ug de Proteína	25	25	25	PM*	25	25	25
N° de bandas	14	13	13	5	14	14	13

Figura 4-2. Electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos de frutos de gulupa almacenados a 20°C (carriles 1, 2 y 3), y 4°C (carriles 5, 6 y 7) en el día 16 de almacenamiento. El carril 4 corresponde al patrón de pesos moleculares.

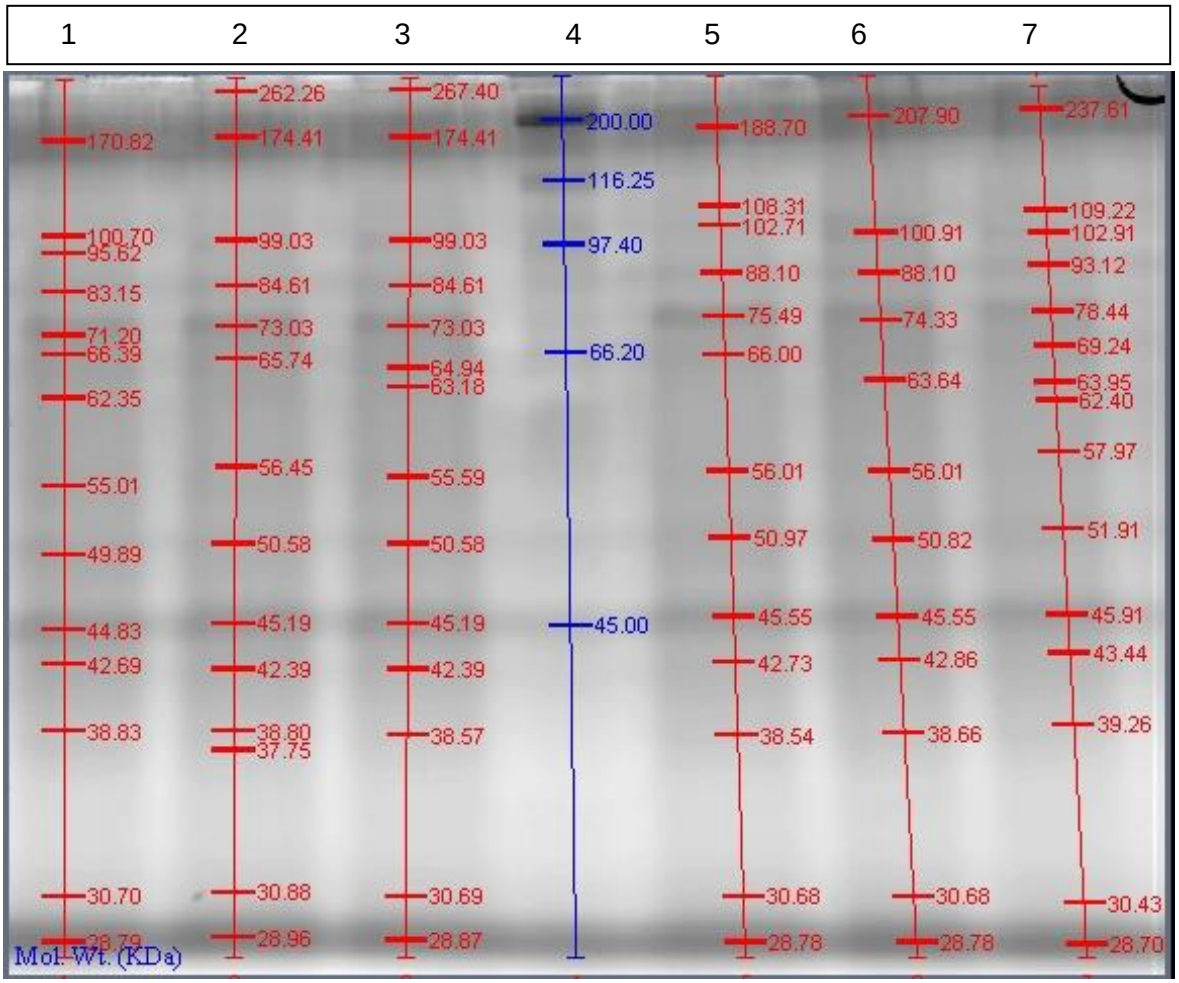


Tabla 4-3. Bandas para la electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos de frutos de gulupa almacenados a 20°C (carriles 1, 2 y 3), y 4°C (carriles 5, 6 y 7) en el día 16 de almacenamiento.

Carril	1	2	3	4	5	6	7
ug de Proteína	25	25	25	PM*	25	25	25
N° de bandas	13	14	14	5	13	12	13

Figura 4-3. Electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos de frutos de gulupa almacenados a 20°C (carriles 1, 2 y 3), y 4°C (carriles 5, 6 y 7) en el día 24 de almacenamiento. Carril 4 patrón de pesos moleculares.

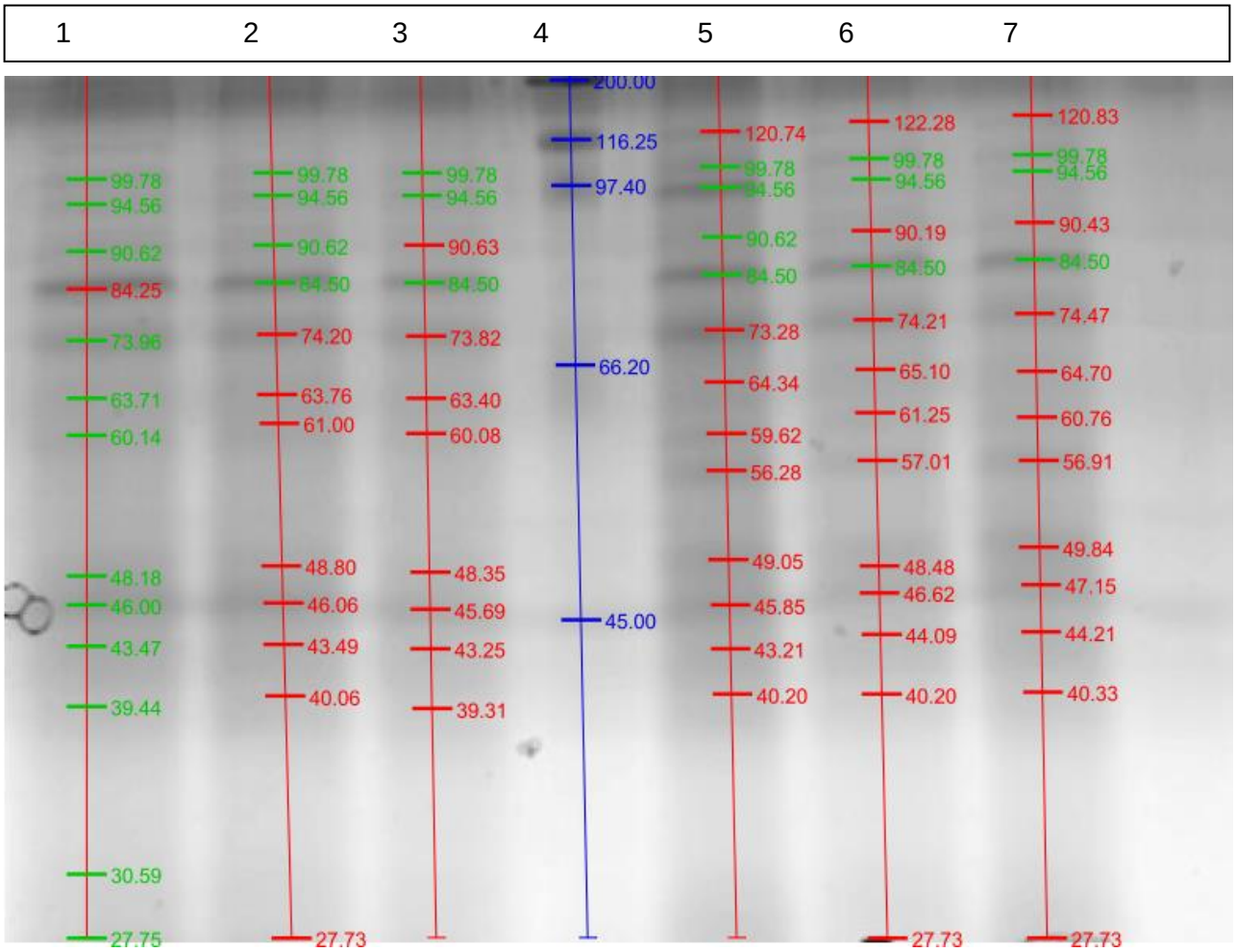


Tabla 4-4. Bandas para la electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos de frutos de gulupa almacenados a 20°C (carriles 1, 2 y 3), y 4°C (carriles 5, 6 y 7) en el día 24 de almacenamiento.

Carril	1	2	3	4	5	6	7
ug de Proteína	25	25	25	PM*	25	25	25
N° de bandas	11	11	10	5	13	13	13

Figura 4-4. Electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos de frutos de gulupa almacenados a 20°C (carriles 1, 2 y 3), y 4°C (carriles 5, 6 y 7) en el día 32 de almacenamiento. Carril 4, patrón de pesos moleculares.

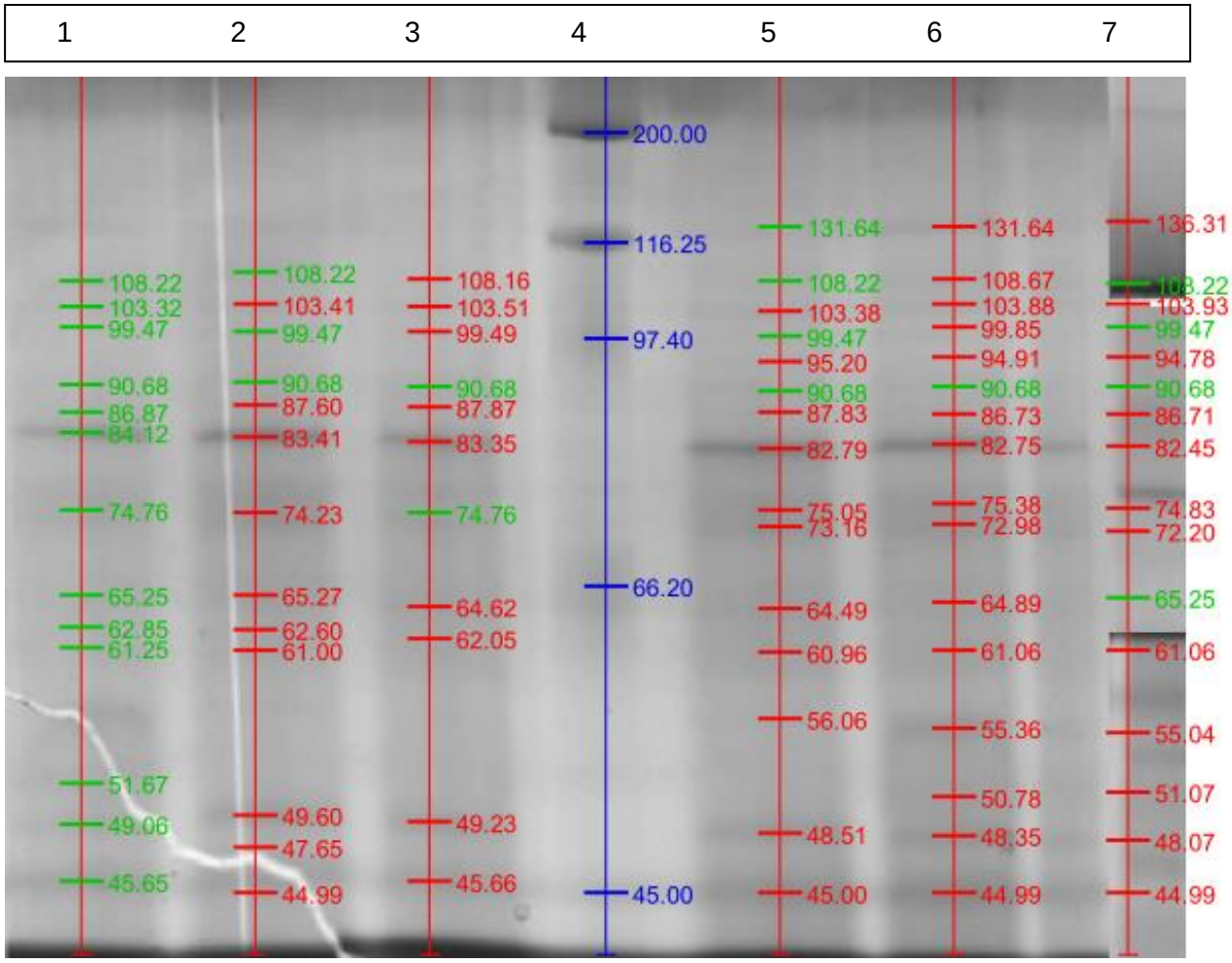


Tabla 4-5. Bandas para la electroforesis unidimensional de extractos de proteína obtenidos de frutos de gulupa almacenados a 20°C (carriles 1, 2 y 3), y 4°C (carriles 5, 6 y 7) en el día 32 de almacenamiento.

Carril	1	2	3	4	5	6	7
ug de Proteína	25	25	25	PM*	25	25	25
N° de bandas	16	15	15	5	15	13	13

4.2.2 Electroforesis bidimensional para los extractos seleccionados de frutos almacenados a 4°C y a 20°C

La Figura 4-5 y la Figura 4-6 muestran los doce geles obtenidos para los extractos de proteína de frutos almacenados, a 4°C (6 geles), y a 20°C (6 geles). Por su parte, la Figura 4-7 muestra el Master Gel proporcionado por el PDQuest el cual muestra todas las manchas detectadas para los dos tratamientos. Se encuentra que se detectaron en total 445 manchas para los geles de frutos almacenados a 4°C, y 441 manchas para el caso de frutos almacenados a 20°C.

Figura 4-5. Vista de los geles obtenidos para los extractos de frutos almacenados a 4°C.

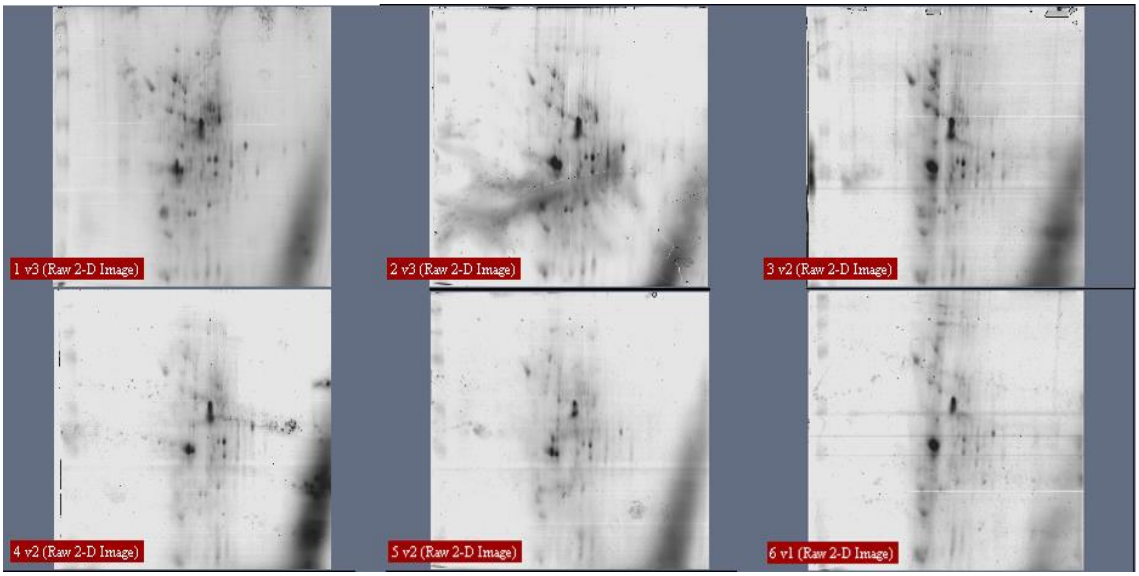
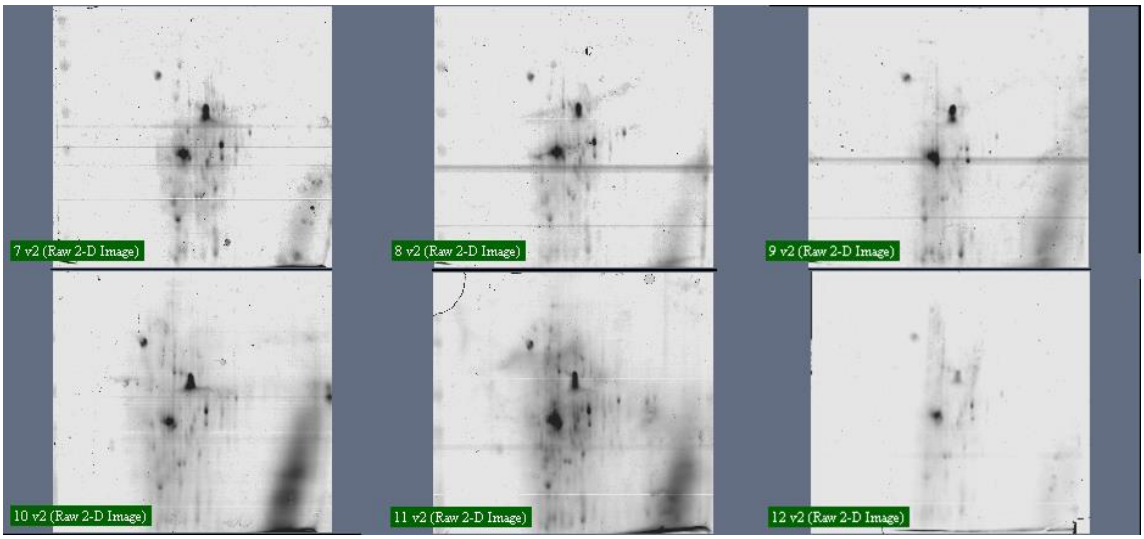


Figura 4-6. Vista de los geles obtenidos para los extractos de frutos almacenados a 20°C.



Del análisis de imágenes llevado a cabo según se describió en el numeral 4.1.7 se seleccionaron las manchas señaladas en el Master Gel de la Figura 4-7. Por su parte, la Tabla 4-6 resume las manchas seleccionadas para la identificación mediante MS/MS.

Figura 4-7. Master Gel obtenido mediante PDQuest®, con las manchas de proteína identificadas como diferenciales.

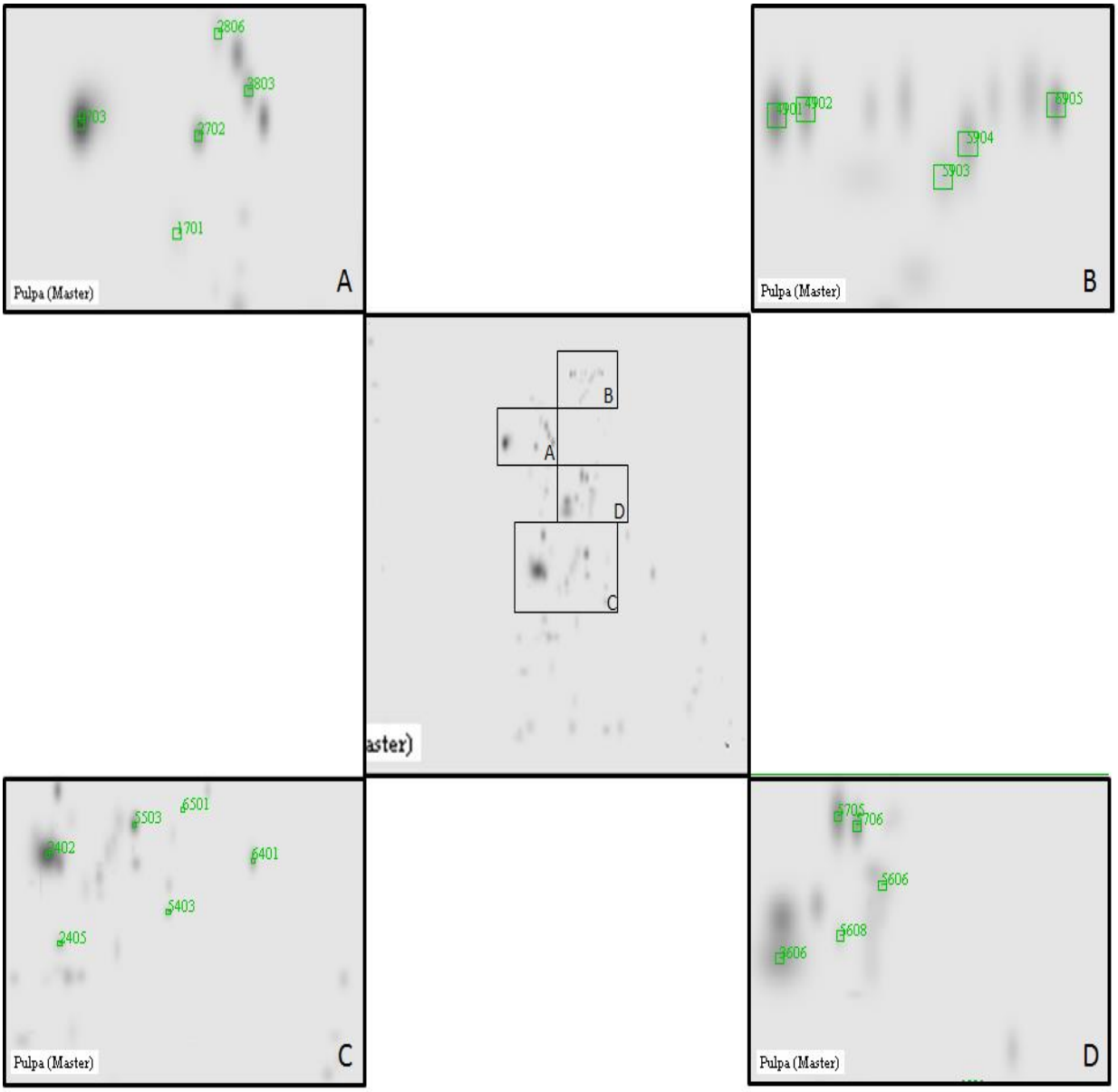


Tabla 4-6. Manchas seleccionadas para la secuenciación.

N. referencia	PM	PI	4°C	20°C
703	59,6	3,7		Aparece
3803	61,9	4,6	Aparece	
4901	101,7	5,1	Aparece	
4902	102	5,2	Aparece	
5403	26,1	6,1	Aparece	
5705	51,6	5,4	Aparece	
5706	51,1	5,6	Aparece	
5903	99	5,7	Aparece	
5904	100,4	5,7	Aparece	
6401	30,1	7,5	Aparece	
6501	35,3	6,4		Aparece
6905	102,2	6	Aparece	
5608	44,7	5,4	Aparece	
1701	52,5	4,3	Aumenta densidad óptica	
2402	29,8	4,5		Aumenta densidad óptica
2405	23,8	4,5	Aumenta densidad óptica	
2702	58,8	4,4	Aumenta densidad óptica	
2806	51,6	5,4	Aumenta densidad óptica	
5606	47,7	5,8	Aumenta densidad óptica	
5503	33,7	5,6		

De esta manera, se encontraron 11 manchas que aparecieron en los frutos almacenados a 4°C, y 2 manchas que aparecieron en los frutos almacenados a 20°C. Por otra parte, se encontró un aumento en la densidad óptica de 5 manchas para frutos almacenados a 4°C y para 1 mancha en los frutos almacenados a 20°C. Por último se seleccionó 1 mancha que presenta una alta densidad óptica en los frutos de los dos tratamientos (5503), con el fin de identificar las posibles proteínas incluidas en la misma.

La Tabla 4 7 muestra los resultados de la identificación de la función de las proteínas secuenciadas.

Del análisis por espectrometría de masas, se obtuvo un listado de 10 proteínas probables para cada mancha. La selección de la proteína más probable se realizó teniendo en cuenta los puntajes (CI%), la cercanía entre los pesos moleculares, los puntos isoeléctricos experimentales y los de las proteínas reportadas en la lista. Seis de las

manchas analizadas se identificaron como proteínas predichas, para estas se realizó la búsqueda por homología en BLAST con el fin de identificar su posible función, dicho análisis solo tuvo resultados para dos de las seis manchas: Serina/treonina Quinasa putativa asociada a pared (4901) y Dihidrolipoillisina-residuo acetiltransferasa componente 3 del complejo piruvato dehidrogenasa (5903), las cuales fueron predichas por BLAST con un 95% y un 84% de homología, respectivamente. Las restantes 4 manchas (703, 5706, 5608 y 2405) no corresponden a ninguna proteína conocida que coincida con la secuencia en un porcentaje de homología significativo.

Por otra parte, se encontraron dos manchas (5403 y 5705) que según el análisis de masas corresponden a la misma proteína, ACC oxidasa, esto se puede deber a que algunas modificaciones postransduccionales pueden incidir en el punto isoeléctrico y/o el tamaño aparente de la proteína, dando como resultado la formación de nuevos spot para la misma proteína [93].

Con el fin de organizar la información obtenida se clasificaron las proteínas identificadas de cada mancha de acuerdo a sus características funcionales y metabólicas en 5 categorías: Biosíntesis (10%), Relacionadas con el estrés (20%), Metabolismo (35%), señalización y transporte (15%), y sin función definida (20%).

La mancha seleccionada por su tamaño y por estar en los geles para los dos tratamientos (5503) se identificó como la proteína de la familia Ribosa-fosfato priofosfoquinasa 4 (Biosíntesis). Dicha proteína se encuentra relacionada con la biosíntesis de nucleótidos, y se ha demostrado que la sobrexpresión de la misma en *A. thaliana* o *N. tabacum* conlleva a un aumento sustancial en la acumulación de biomasa bajo distintas condiciones de crecimiento [94].

En los frutos almacenados a 20°C se encontró la aparición de dos manchas que no se observan para los frutos almacenados a 4°C identificadas como Proteína hipotética OsJ_19331 (703) y Proteína homóloga relacionada al ácido abscísico y estrés por maduración (6501). Por otra parte, se encontró una mancha que aumenta su densidad óptica identificada como Glutamina sintetasa PR-2 (2402).

La proteína homologa relacionada al estrés y ácido abscísico ha sido reportada como sobrexpresada en eventos de estrés durante la maduración de frutos, aunque se desconoce su función fisiológica [95]. En banano se ha reportado como crucial en la

regulación de genes expresado después del climaterio [95] y en uva los datos han sugerido que se encuentra envuelta en la vía de señalización de ABA [96]. Por su parte la Glutamina sintetasa PR-2 es una enzima involucrada en la fijación de nitrógeno ya que cataliza la reacción de síntesis de glutamina a glutamato, se ha reportado que es sobrexpresada en frutos cítricos durante la maduración [97], así como en frutos sometidos a tratamientos térmicos [95] de manera que se ha sugerido que desempeña un rol importante en la protección de la fotosíntesis durante eventos de estrés [98]. Los datos obtenidos muestran que los frutos almacenados a 20°C muy probablemente se encuentran en un proceso de maduración, en el que se observa un aumento en la densidad óptica de las manchas asociadas a dichas proteínas.

De las manchas que aparecen en las electroforesis para los frutos almacenados a 4°C se identificaron en la categoría de relacionadas con el estrés las proteínas ACC oxidasa (5403 y 5705), la proteína de choque término citosólica 70 (5904) y la Serina/treonina Quinasa putativa asociada a pared (4901). La ACC oxidasa es la enzima que catalaniza el último paso de la biosíntesis de etileno, dicha enzima ha sido identificada como importante en el proceso de maduración de frutos de durazno [8] y en *Capsicum annuum* L. en el cual se reportó su aparición en los estados maduros del fruto [99], y se ha reportado que la acumulación de dicha proteína es altamente dependiente de las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono [73] asociados a atmósferas modificadas. La proteína de choque térmico citosólica 70 ha demostrado ser importante para procesos como el plegamiento de la proteína, la translocación de proteínas, y la respuesta a estrés; por ejemplo, en frutas como la mandarina se ha reportado su sobrexpresión asociada a procesos de choque térmico [70], sin embargo, la función específica en las plantas superiores todavía no se ha dilucidado [100].

De las manchas que aparecen clasificadas dentro de la categoría de metabolismo para los frutos almacenados a 4°C se identificaron las proteínas ureidoglicolato hidrolasa (3803), Enolasa (6401), Fosfoenolpiruvatocarboxilasa (1701), Proteína Aconitasa (2702), Gliceraldehide-3-dehidrogenasa subunidad C (2806), Dihidrolipoillisina-residuo acetiltransferasa componente 3 de complejo piruvatodehidrogenasa (5903).

La proteína ureidoglicolato hidrolasa se encuentra relacionada al catabolismo de nucleótidos de purina sin la generación intermedia de úrea [4] proceso que es necesario para la reutilización de anillos de purina en plantas [101]. Por su parte, la proteína enolasa cataliza la transformación de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, y se ha propuesto como un regulador positivo de la respuesta al estrés por frío [102]. La proteína fosfoenolpiruvatocarboxilasa ha sido relacionada en los eventos de estrés por choque térmico en maní, maíz y soja [103], y en frutos de durazno sometidos a choque térmico se reportó un aumento en su actividad [104]. La proteína aconitatohidratasa cataliza la conversión de citrato a isocitrato como primera etapa del catabolismo del ácido cítrico [93], y ha sido reportada como una proteína marcador en eventos de estrés por frío en raíces de arroz [105], aunque existen estudios que indican lo contrario (que la expresión de dicha proteína se ve inhibida en eventos de estrés oxidativo en Arabidopsis [106]). En frutas, la actividad de dicha enzima ha sido reportada durante el proceso de maduración [107, 108]. Por otra parte, la proteína gliceraldehide-3-dehidrogenasa subunidad C es una enzima ubicua implicada en la glicólisis y la gluconeogénesis, y se ha reportado que es uno de los genes diana que regulan la respuesta de las células al estrés salino y puede ayudar en el desarrollo de nuevos cultivares tolerantes a la sal en la soja [109, 110].

De las manchas que aparecen clasificadas para los frutos almacenados a 4°C dentro de la categoría de señalización y transporte se identificaron las proteínas ATPasa V-tipo protón subunidad B 2 (4902), isoforma H+-ATPasa Vacuolar subunidad A1 (6905) y Proteína Rab (5606). De las cuales para ATPasa V-tipo protón subunidad B 2 se ha reportado su sobrexpresión en plantas sometidas a estrés salino [111, 112].

El hecho de que la densidad óptica de manchas asociadas a proteínas que han sido reportadas como expresadas en condiciones de estrés y asociado a los cambios fisicoquímicos encontrados en los frutos, indica que el almacenamiento de los frutos a 4°C puede no ser el ideal. Estos resultados se encuentran acordes a lo reportado previamente en el grupo de investigación, puesto que Melgarejo, L. et al. [83], establece que las mejores condiciones de almacenamiento del fruto corresponden a la selección de un empaque adecuado y la refrigeración entre 8-12 °C.

---

[4] http://www.uniprot.org/uniprot/Q2QMN7

Tabla 4-7. Identificación de la función de las proteínas secuenciadas.

Proteína (función relacionada)	Especie	ID NCBI	Número de proteína SSP/ tratamiento	Puntaje de proteína C.I.%	Péptidos coincidentes	Experimental		Teórico	
						PM(Da)	pI	PM(Da)	pI
Biosíntesis									
Proteína de la familia Ribosa- fosfato pirofosfoquinasa 4	Populus trichocarpa	XP_002300881.1	5503	100	6	33,7	5,6	36,9	6,2
Glutamina sintetasa PR-2	Phaseolusvulgaris	P04771.1	2402/ Aumenta 20°C	100	2	30,7	4,4	39,3	5,4
Relacionadas con el estrés									
ACC oxidasa	Passiflora edulis	BAA37133.1	5403	99,9	7	26,1	6,1	29,5	5,6
			5705 Aparece 4°C	93.9	7	51,6	5,4	29,5	5,6
Proteína de choque térmico citosólica 70	Spinacia oleracea	AAB97316.1	5904 Aparece 4°C	100	22	100,4	5,7	71,8	5,9
Proteína homóloga relacionada al ácido abscísico y estrés por maduración	Prunus armeniaca	AAB97140.1	6501 Aparece 20°C	99,9	3	35,3	6,4	21,2	5,64
Serina/treonina Quinasa putativa asociada a pared predicha por BLAST 95% de homología	Oryza sativa	BAD08905.1	4901 Aparece 4°C	80	12	101,7	5,1	84,3	8,1
Metabolismo									
Probable ureidoglicolato hidrolasa	Oryza sativa	Q2QMN7.2	3803 Aparece 4°C	98	11	61,9	4,6	51,7	5,34
Enolasa	Solanum lycopersicum	CAA41116.1	6401 Aparece 4°C	99,9	8	30,1	7,5	35,3	6,3

Fosfoenol piruvato carboxylasa	Lygeum spartum	CAM83992.1	1701 Aumenta 4°C	94,5	10	52,5	4,3	49,4	5,7
Proteína Aconitasa	Litchichinensis	ADZ57218.1	2702 Aumenta 4°C	97,4	9	58,8	4,4	57	5,1
Gliceraldehide-3-dehidrogenasa subunidad C	Glycine max	NP_001237544.1	2806 Aumenta 4°C	100	12	51,6	5,4	36,8	6,7
Dihidrolipoillisina-residuo acetiltransferasa componente 3 de complejo piruvato dehidrogenasa, mitocondrial 84% de homología en Blast	Oryza sativa	EMT27967.1	5903 Aparece 4°C	100	5	99	5,7	45,2	5,3
Señalización y transporte									
ATPasa V-tipo protón subunidad B 2	Hordeum vulgare	gi|2493132	4902 Aparece 4°C	100	29	102	5,2	53,8	5,1
Vacuolar H+-ATPasa A1 subunidad isoforma	Solanum lycopersicum	NP_001234281.1	6905 Aumenta 20°C	100	15	102,2	6	69	5,5
Proteína Rab	Pellia endiviifolia	AEG74033.1	5606 Aumenta 4°C	98,6	9	47,7	5,8	24,1	6,3
Sin función definida									
Proteína hipotética OsJ_19331	Oryza sativa	EEE64481.1	703 Aparece 20°C	84,2	10	59,6	3,7	55,3	4,9
Proteína hipotética CHLNCDRAFT_36787	Chlorella variabilis	gi|552816913|	5706 Aparece 4°C	95,1	11	51,1	5,6	74,1	5,2
Proteína predicha	Hordeum vulgare subsp. vulgare	BAJ90220.1	5608 Aparece 4°C	98,4	10	44,7	5,4	47,9	5,7
Proteína predicha	Physcomitrellapatens	XP_001778987	2405 Aumenta 4°C	93,1	10	23,8	4,5	51	6,3

5. Conclusiones generales

Se encontró que los sólidos solubles y la acidez titulable disminuyen con el tiempo en los frutos almacenados a 20°C, mientras que el pH aumenta de manera significativa comparado con los frutos almacenados a 4°C. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos propuestos y en los parámetros fisicoquímicos evaluados para los días 24 y 32 de almacenamiento.

Para la extracción del proteoma de gulupa la metodología más adecuada fue la número 3, propuesta por Wang et al 2006.

Mediante electroforesis bidimensional se encontraron 11 manchas proteicas que aparecieron en los frutos almacenados a 4°C, y 2 manchas que aparecen en los frutos almacenados a 20°C, mientras que se encontró un aumento en la densidad óptica de 5 manchas para frutos almacenados a 4°C y para 1 mancha en los frutos almacenados a 20°C.

Las manchas que aparecen o aumentan su densidad óptica en los frutos almacenados a 20°C se han reportado como asociadas a la maduración del fruto. Mientras que aquellas relacionadas con el tratamiento a 4°C se encuentran relacionadas en su mayoría a eventos de estrés, como es el estrés por frío.

El análisis de la caracterización de las proteínas presentes en la gulupa mediante proteómica junto con los estudios de la fisiología del fruto durante el almacenamiento, proporcionan herramientas útiles para la selección de las mejores condiciones poscosecha de almacenamiento de frutos, por lo cual el grupo de investigación se encuentra aplicando dichos conocimientos a otras variedades vegetales y en otros eventos de estrés.

6. Bibliografía General

1. Angulo, R., *El cultivo de la gulupa Passiflora edulis Sims*. Memorias Seminario Nacional sobre Pasifloráceas. 2008, Bogotá: Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas.
2. Jimenez, Y., *Cultivo de la Gulupa Passiflora edulis SIMS*, in *Facultad de Agronomía.*2006, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá.
3. Jiménez, Y., C. Carranza, and M. Rodriguez, *Manejo integrado del cultivo de Gulupa (Passiflora edulis Sims)*, in *Cultivo, poscosecha y comercialización de las pacifloraceas en Colombia: Maracuyá, granadilla, gulupa y curuba.*, D. Miranda, et al., Editors. 2009: Bogotá.
4. Ocampo, J. and W. Kris, *Tecnología para el cultivo de la gulupa en Colombia (Passiflora edulis f. edulis Sims)*. 2012, Bogotá: Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Jorge Tadeo Lozano. 68.
5. Pinzón, I., G. Fischer, and G. Corredor, *Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (Passiflora edulis Sims.).* Agronomía Colombiana 2007. **25**: p. 83-95.
6. Faurobert, M., et al., *Major Proteome Variations Associated with Cherry Tomato Pericarp Development and Ripening.* Plant Physiol., 2007. **143**(3): p. 1327-1346.
7. Muccilli, V., et al., *Proteome analysis of Citrus sinensis L. (Osbeck) flesh at ripening time.* Journal of Proteomics, 2009. **73**(1): p. 134-152.
8. Nilo, R., et al., *Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE).* BMC Genomics, 2010. **11**(1): p. 43.
9. Pedreschi, R., et al., *Gel-Based Proteomics Approach to the Study of Metabolic Changes in Pear Tissue during Storage.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(15): p. 6997-7004.
10. Ocampo, J. and K. Wyckhuys, *Tecnología para el cultivo de la Gulupa en Colombia*, ed. U.d.B.J.T. Lozano. 2012.
11. Acevedo-Rodriguez, P., *Los bejucos de Puerto Rico.* Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, ed. G.T.R.S.-. U.S. Vol. 11. 1985, New Orleans, LA.
12. Bailey, L.H., *The standard cyclopedia of horticulture*. Vol. 3. 1948, New York. : The MacMillan Co.
13. Hurtado, J. and A. Nieto, *Adaptación fisiológica y producción de una Passifloracea silvestre; Passiflora malliformis L. en un piso térmico cálido.*, in *Facultad de Agronomía*1985, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá.
14. Melgarejo, L.M., et al., *Ecofisiología del cultivo de la Gulupa*, ed. U.N.d. Colombia. 2012.

15. Miranda, D., et al., *Cultivo, poscosecha y comercialización de pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba.* 2009: Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas.
16. Ocampo, J., et al., *AFLPs analysis for the study of genetic relationships among cultivated Passiflora species of the subgenera Passiflora and Tacsonia.* Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, 2004. **48**: p. 72-76.
17. Ortiz, D., et al., *Evaluating purple passion fruit (Passiflora edulis Sims f. edulis) genetic variability in individuals from commercial plantations in Colombia.* Genetic Resources and Crop Evolution, 2012. **59**(6): p. 1089-1099.
18. Kader, A.A., *Fruit madurity, ripening, and quality relationships.* Acta Horticulturae, 1999. **485**: p. 203-208.
19. Kader, A.A. and D.M. Barrett, *Classification, composition of fruits, and portharvest maintenance of quality*, in *Processing Fruits; Science and technology*, D.M. Barrett, L. Somogyi, and H. Ramaswamy, Editors. 2004, CRC PRESS: London.
20. Galindo, F.G.m., et al., *Factors Affecting Quality and Postharvest Properties of Vegetables: Integration of Water Relations and Metabolism.* Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2004. **44**(3): p. 139-154.
21. Galindo, F.G.m., et al., *Plant Stress Physiology: Opportunities and Challenges for the Food Industry.* Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2007. **47**(8): p. 749-763.
22. Raghavan, G.S.V., et al., *Refrigerated an controlled/modified atmosphere storage*, in *Processing Fruits; Science and technology.*, D.M. Barrett, L. Somogyi, and H. Ramaswamy, Editors. 2004, CRC PRESS: London.
23. Das, E., G.C. Gürakan, and A. BayIndIrlI, *Effect of controlled atmosphere storage, modified atmosphere packaging and gaseous ozone treatment on the survival of Salmonella Enteritidis on cherry tomatoes.* Food Microbiology, 2006. **23**(5): p. 430-438.
24. Kader, A.A., et al., *Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1989. **28**(1): p. 1-30.
25. Li, T., M. Zhang, and S. Wang, *Effects of modified atmosphere packaging with a silicon gum film as a window for gas exchange on Agrocybe chaxingu storage.* Postharvest Biology and Technology, 2007. **43**(3): p. 343-350.
26. Smith, J.P., D. Zagory, and H. Ramaswamy, *Packing of fruits and vegetables*, in *Processing Fruits; Science and technology.*, D.M. Barrett, L. Somogyi, and H. Ramaswamy, Editors. 2004, CRC PRESS.: London.
27. Old, W.M., et al., *Comparison of Label-free Methods for Quantifying Human Proteins by Shotgun Proteomics.* Molecular & Cellular Proteomics, 2005. **4**(10): p. 1487-1502.

28. Barraclough, D., et al., *A general method for two-dimensional protein electrophoresis of fruit samples.* Postharvest Biology and Technology, 2004. **32**(2): p. 175-181.
29. Abdi, N., P. Holford, and B. McGlasson, *Application of two-dimensional gel electrophoresis to detect proteins associated with harvest maturity in stonefruit.* Postharvest Biology and Technology, 2002. **26**(1): p. 1-13.
30. Carpentier, S.C., et al., *Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis.* PROTEOMICS, 2005. **5**(10): p. 2497-2507.
31. Dakshinamurthy, R., et al., *Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate.* Protein Science, 2009. **18**(5): p. 980-993.
32. Görg, A., W. Weiss, and M.J. Dunn, *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics.* Proteomics, 2004. **4**: p. 3665–3685.
33. Jorrín, J.V., A.M. Maldonado, and M.A. Castillejo, *Plant proteome analysis: A 2006 update.* PROTEOMICS, 2007. **7**(16): p. 2947-2962.
34. Jorrín-Novo, J.V., et al., *Plant proteomics update (2007-2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge.* Journal of Proteomics, 2009. **72**(3): p. 285-314.
35. Ramu, S.S. and K.C.R. Jocelyn, *A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues.* PROTEOMICS, 2004. **4**(9): p. 2522-2532.
36. Zheng, Q., et al., *Qualitative and Quantitative Evaluation of Protein Extraction Protocols for Apple and Strawberry Fruit Suitable for Two-Dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry Analysis.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(5): p. 1663-1673.
37. Bjellqvist, B., et al., *A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale.* Electrophoresis, 1993. **14**(1): p. 1357-1365.
38. Laemmli, U.K., *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
39. Neuhoff, V., R. Stamm, and H. Eibl, *Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis.* Electrophoresis, 1985. **6**(9): p. 427-448.
40. Shevchenko, A., et al., *Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels.* Analytical Chemistry, 1996. **68**(5): p. 850-858.
41. Lilley, K.S. and D.B. Friedman, *Difference gel electrophoresis DIGE.* Drug Discovery Today: Technologies, 2006. **3**(3): p. 347-353.
42. Zhang, X., et al., *Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics--A review.* Analytica Chimica Acta. **664**(2): p. 101-113.

43. Ong, S.-E., et al., *Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics.* Molecular & Cellular Proteomics, 2002. **1**(5): p. 376-386.
44. Gygi, S.P., et al., *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags.* Nature Biotechnology, 1999. **17**(10): p. 994.
45. Dunkley, T.P.J., et al., *The use of isotope-coded affinity tags (ICAT) to study organelle proteomes in Arabidopsis thaliana. .* Biochem. Soc. Trans., 2004. **32**(Pt 3): p. 520-523.
46. Wiese, S., et al., *Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research.* PROTEOMICS, 2007. **7**(3): p. 340-350.
47. Yates, J.R., C.I. Ruse, and A. Nakorchevsky, *Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications.* Annual Review of Biomedical Engineering, 2009. **11**(1): p. 49-79.
48. Liska, A.J. and A. Shevchenko, *Combining mass spectrometry with database interrogation strategies in proteomics.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2003. **22**(5): p. 291-298.
49. El-Aneed, A., A. Cohen, and J. Banoub, *Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers.* Applied Spectroscopy Reviews, 2009. **44**(3): p. 210-230.
50. Stump, M.J., et al., *MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION MASS SPECTROMETRY.* Applied Spectroscopy Reviews, 2002. **37**(3): p. 275-303.
51. Mann, M., R.C. Hendrickson, and A. Pandey, *ANALYSIS OF PROTEINS AND PROTEOMES BY MASS SPECTROMETRY.* Annual Review of Biochemistry, 2001. **70**(1): p. 437-473.
52. Hendrickson, C.L. and M.R. Emmett, *ELECTROSPRAY IONIZATION FOURIER TRANSFORM ION CYCLOTRON RESONANCE MASS SPECTROMETRY.* Annual Review of Physical Chemistry, 1999. **50**(1): p. 517-536.
53. Marshall, A.G. and C.L. Hendrickson, *High-Resolution Mass Spectrometers.* Annual Review of Analytical Chemistry, 2008. **1**(1): p. 579-599.
54. Toledo, T.T., et al., *Proteomic analysis of banana fruit reveals proteins that are differentially accumulated during ripening.* Postharvest Biology and Technology, 2012. **70**(0): p. 51-58.
55. Nogueira, S.B., et al., *Proteomic analysis of papaya fruit ripening using 2DE-DIGE.* Journal of Proteomics, 2011(0).
56. Prinsi, B., et al., *Peach fruit ripening: A proteomic comparative analysis of the mesocarp of two cultivars with different flesh firmness at two ripening stages.* Phytochemistry. **72**(10): p. 1251-1262.
57. Minas, I.S., et al., *Physiological and proteomic approaches to address the active role of ozone in kiwifruit post-harvest ripening.* J Exp Bot., 2012. **63**(7): p. 2449-2264.

58. Deytieux, C., et al., *Proteome analysis of grape skins during ripening.* Journal of Experimental Botany, 2007. **58**(7): p. 1851-1862.
59. Negri, A.S., et al., *Analysis of grape berry cell wall proteome: A comparative evaluation of extraction methods.* Journal of Plant Physiology, 2008. **165**(13): p. 1379-1389.
60. Bianco, L., et al., *Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes.* Journal of Proteomics, 2009. **72**(4): p. 586-607.
61. Rocco, M., et al., *Proteomic analysis of tomato fruits from two ecotypes during ripening.* PROTEOMICS, 2006. **6**(13): p. 3781-3791.
62. Casado-Vela, J., S. Sellés, and R. Bru Martínez, *Proteomic approach to blossom-end rot in tomato fruits (Lycopersicon esculentum M.): Antioxidant enzymes and the pentose phosphate pathway.* PROTEOMICS, 2005. **5**(10): p. 2488-2496.
63. Saravanan, R.S. and J.K.C. Rose, *A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues.* PROTEOMICS, 2004. **4**(9): p. 2522-2532.
64. Pedreschi, R., et al., *Proteomic analysis of core breakdown disorder in Conference pears (Pyrus communis L.).* PROTEOMICS, 2007. **7**(12): p. 2083-2099.
65. Pedreschi, R., et al., *Metabolic profiling of [`]Conference' pears under low oxygen stress.* Postharvest Biology and Technology, 2009. **51**(2): p. 123-130.
66. Hjernø, K., et al., *Down-regulation of the strawberry Bet v 1-homologous allergen in concert with the flavonoid biosynthesis pathway in colorless strawberry mutant.* PROTEOMICS, 2006. **6**(5): p. 1574-1587.
67. Song, J., et al., *A simple protocol for protein extraction of recalcitrant fruit tissues suitable for 2-DE and MS analysis.* Electrophoresis, 2006. **27**(15): p. 3144-3151.
68. Guarino, C., et al., *Proteomic analysis of the major soluble components in Annurca apple flesh.* Molecular Nutrition & Food Research, 2007. **51**(2): p. 255-262.
69. Herndl, A., et al., *Mapping of Malus domestica allergens by 2-D electrophoresis and IgE-reactivity.* Electrophoresis, 2007. **28**(3): p. 437-448.
70. Yun, Z., et al., *Comparative proteomics analysis of differentially accumulated proteins in juice sacs of ponkan (Citrus reticulata) fruit during postharvest cold storage.* Postharvest Biology and Technology, 2010. **56**(3): p. 189-201.
71. Katz, E., et al., *The citrus fruit proteome: insights into citrus fruit metabolism.* Planta, 2007. **226**: p. 989 - 1005.
72. Zhang, L., et al., *Effect of post-harvest heat treatment on proteome change of peach fruit during ripening.* Journal of Proteomics. **74**(7): p. 1135-1149.

73. Pedreschi, R., et al., *Physiological implications of controlled atmosphere storage of 'Conference' pears (Pyrus communis L.): A proteomic approach.* Postharvest Biology and Technology, 2008. **50**(2-3): p. 110-116.
74. Jaillon, O., et al., *The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla.* Nature, 2007. **449**(7161): p. 463-467.
75. LaBaer, J. and N. Ramachandran, *Protein microarrays as tools for functional proteomics.* Current Opinion in Chemical Biology, 2005. **9**(1): p. 14-19.
76. Giepmans, B.N.G., et al., *The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function.* Science, 2006. **312**(5771): p. 217-224.
77. Kader, A.A., *Fruit maturity, ripening, and quality relationships.* Acta Horticulturae, 1999. **485**: p. 203-208.
78. Jiménez, A.M., et al., *Physicochemical characterisation of gulupa (Passiflora edulis Sims. fo edulis) fruit from Colombia during the ripening.* Food Research International, 2011. **44**(7): p. 1912-1918.
79. Melgarejo, L.M., et al., *Desarrollo de empaques poliméricos apropiados para la comercialización de gulupa en fresco (Passiflora edulis Sims).* in *Poscosecha de la Gulupa (Passiflora edulis Sims).* 2011, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá.
80. ICONTEC, *NTC 4623. Productos de frutas y verduras. Determinacion de la acidez titulable.* 1999.
81. *El espacio de color L*C*h*. [cited 2014 Enero]; Available from: http://gusgsm.com/espacio_color_lch.
82. *El color en L*C*h*. [cited 2014 Enero]; Available from: http://www.lfrivera-itgt.com/2010/05/el-color-en-lch_04.html.
83. Melgarejo, L.M., et al., *Caracterización fisicoquímica de frutos de gulupa (Passiflora edulis Sims) bajo condiciones de almacenamiento.*, in *Poscosecha de la Gulupa (Passiflora edulis Sims).* 2011, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá.
84. Matta, F., et al., *Bulletin 1153. Studies on Postharvest Quality of Passion Fruit*. 2006: Division of Agriculture, Forestry, and Veterinary Medicine at Mississippi State University.
85. Diaz, R.O., et al., *POSTHARVEST BEHAVIOR OF PURPLE PASSION FRUIT IN XTEND® BAGS DURING LOW TEMPERATURE STORAGE. .* Acta Horticulturae, 2012. **934**(XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on Postharvest Technology in the Global Market).
86. Wang, W., et al., *A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis.* Electrophoresis, 2006. **27**: p. 2782-2786.
87. O'Farrell, P.H., *High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins.* The Journal of Biological Chemistry, 1975. **250**(10): p. 4007–4021. .

88. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Analytical Biochemistry 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
89. Dyballa, N. and S. Metzger. *Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteins in Polyacrylamide Gels*. 2009 [cited 2014 Enero]; Available from: http://www.jove.com/video/1431/fast-sensitive-colloidal-coomassie-g-250-staining-for-proteins?id=143.
90. Shapiro, S.S. and M.B. Wilk, *An analysis of variance test for normality (complete samples).* Biometrika, 1965. **52**(3-4): p. 591-611.
91. Neter, J., et al., *Applied Linear Statistical Models* 1996, Chicago: Irwin Press/McGrawHill.
92. Shevchenko, A., et al., *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.* Anal Chem., 1996. **68**(5): p. 850-858.
93. Huang, H., I.M. Moller, and S.Q. Song, *Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos.* J Proteomics., 2011. **75**(4): p. 1247-1262.
94. Koslowsky, S., et al., *Higher biomass accumulation by increasing phosphoribosylpyrophosphate synthetase activity in Arabidopsis thaliana and Nicotiana tabacum.* Plant Biotechnol J., 2008. **6**(3): p. 281–294.
95. Jiang, L., et al., *Proteomic analysis of peach fruit during ripening upon post-harvest heat combined with 1-MCP treatment.* Journal of Proteomics, 2014. **98**(0): p. 31-43.
96. Çakir, B., et al., *A Grape ASR Protein Involved in Sugar and Abscisic Acid Signaling.* The Plant Cell Online, 2003. **15**(9): p. 2165-2180.
97. Katz, E., et al., *Label-free shotgun proteomics and metabolite analysis reveal a significant metabolic shift during citrus fruit development.* Journal of Experimental Botany, 2011. **62**(15): p. 5367-5384.
98. Li, W., et al., *Proteomics Analysis of Alfalfa Response to Heat Stress.* PLoS ONE, 2013. **8**(12): p. e82725.
99. Aizat, W.M., et al., *Proteomic analysis during capsicum ripening reveals differential expression of ACC oxidase isoform 4 and other candidates.* Functional Plant Biology, 2013. **40**(11): p. 1115-1128.
100. Su, P.-H. and H.-m. Li, *Arabidopsis Stromal 70-kD Heat Shock Proteins Are Essential for Plant Development and Important for Thermotolerance of Germinating Seeds.* Plant Physiology, 2008. **146**(3): p. 1231-1241.
101. Werner, A.K., et al., *Identification, Biochemical Characterization, and Subcellular Localization of Allantoate Amidohydrolases from Arabidopsis and Soybean.* Plant Physiology, 2008. **146**(2): p. 418-430.
102. Sánchez, P., et al., *Understanding the mechanisms of chilling injury in bell pepper fruits using the proteomic approach.* Journal of Proteomics, 2012. **75**(17): p. 5463-5478.
103. Ghosh, S., et al., *Thermal Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase in C3 and C4 Plants Native to Hot and Temperate Climates.* Plant Physiology, 1989. **90**(4): p. 1298-1304.

104. Lara, M.V., et al., *Biochemical and proteomic analysis of 'Dixiland' peach fruit (Prunus persica) upon heat treatment.* Journal of Experimental Botany, 2009. **60**(15): p. 4315-4333.
105. Lee, D.-G., et al., *Chilling stress-induced proteomic changes in rice roots.* Journal of Plant Physiology, 2009. **166**(1): p. 1-11.
106. Yan, S.-P., et al., *Comparative Proteomic Analysis Provides New Insights into Chilling Stress Responses in Rice.* Molecular & Cellular Proteomics, 2006. **5**(3): p. 484-496.
107. Sarry, J.-E., et al., *Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp.* PROTEOMICS, 2004. **4**(1): p. 201-215.
108. Palma, J.M., F.J. Corpas, and L.A. del Río, *Proteomics as an approach to the understanding of the molecular physiology of fruit development and ripening.* Journal of Proteomics, 2011. **74**(8): p. 1230-1243.
109. Xu, X.Y., et al., *Proteomic analysis of seed germination under salt stress in soybeans.* J Zhejiang Univ Sci B., 2011. **2**(7): p. 507-517.
110. Nouri, M.-Z. and S. Komatsu, *Comparative analysis of soybean plasma membrane proteins under osmotic stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches.* PROTEOMICS, 2010. **10**(10): p. 1930-1945.
111. Wang, B., U. Lüttge, and R. Ratajczak, *Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte Suaeda salsa.* Journal of Experimental Botany, 2001. **52**(365): p. 2355-2365.
112. Dietz, K.J., et al., *Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level.* Journal of Experimental Botany, 2001. **52**(363): p. 1969-1980.

7. Productos obtenidos con el desarrollo del trabajo de tesis

Presentación de resultados obtenidos en congresos o simposios

- Análisis de aproximación proteómica en frutos de gulupa *Passiflora edulis* Sims. Sandra Carolina Crespo Cárdenas, Nohora Angélica Vega Castro y Luz Marina Melgarejo. Agricultura y Desarrollo Rural, poster 444, Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo, 23, 24 y 24 de Septiembre 2010, Bogotá D.C.ISBN 978-958-719-571-2.
- Evaluación cualitativa y cuantitativa de protocolos de extracción del proteoma de gulupa *Passiflora edullis* SIMS. Sandra Carolina Crespo Cárdenas, Nohora Angélica Vega, Luz Marina Melgarejo. Congreso Iberoamericano de Biotecnología y Biodiversidad. Septiembre 1 a 4, Manizales, Colombia, 2010. Página 38 memorias.

.

A. Anexo: Identificación de proteínas asociadas a manchas diferenciales en la electroforesis 2D para frutos de gulupa sometidos a dos temperaturas poscosecha

Se presentan las secuencias identificadas en las manchas diferenciales seleccionadas después del análisis de aproximación proteómica de frutos almacenados a 4°C y 20°C

Mancha 0703 Proteína hipotética OsJ_19331; EEE64481.1
Porcentaje de la secuencia cubierto: 35%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
  1 MKVAAVPPTA ATYALYLSAL AARRLPDAAL HHLRLISRPG SPVPPSPTAY
 51 RVVVKSLVVD HGRLTDALEL KDEMLASGFV GPDPQVYNLL MAGFVEAGDG
101 AKAVELYEEL KEKIGREPIL DGIVYGSLMK AYFLMGMEEK AMECYKEVLG
151 AESEVRFGAE SYNGVVDAFG RNRRLDDAIE LFERMLREHD PPLKIAVDVR
201 SFSVIVDAYC AAGRFGDAIS WFRRMGEWEV VADVAAYNNL IRHLSLQGLV
251 SEAELLYKEM GESGLKADEE TYVLLMQGCF RVDRIDEGIN YFDGMAELGL
301 KPDATAYHKI VDGLIGFGML DNAHGYLDKM RGKEISPSIA SYEALLKAYI
351 GEASLDKSID IAKDILLDEK VVFSDEMRDL LEGALREAGR EGDITKLYED
401 VEEKKAEAAA RAEEEKARAE ALAREEREKR RAEAAAKDEA AARASAAAIE
451 AILGHKRKTE NVTGEPAPDA NSLDGVFQSR FGITSAGDGA LQGTSSGGET
501 KQGDGH
```

Mancha 3803 Probable ureidoglicolato hidrolasa; Q2QMN7.2

Porcentaje de la secuencia cubierto: 28%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
MATSAAARFL AALAGAAVLL VLLGGAAGAV VGHDDDAAAA RRTMEEFAGF
    51 PASDYRGDAG GGSGGSSPFY VDSDGLQRQI DELASFSDSP VPSVTRVLYS
   101 DKDVQARRYI KGIMNQLGLS IREDAVGNIF GRWEGSEAGL GAVATGSHVD
   151 AIPFSGKYDG VVGVLGALEA ISMLKRSGFQ PKRSLEVIMF TSEEPTRFGI
   201 SCLGSRLMAG SEELARSLKE TVDNQNVSFF DAADSAGYKM HPEELHNVFL
   251 KKDDYFAFVE LHIEQGPILE KEGIKIGVVT AIAAPASIKV EFEGNGGHAG
   301 AVLMPARNDA GLAAAELALA VEKHVLESGS IDTVGTVGIL QLHPGAINSI
   351 PSKSHVEIDV RDIDEKRRNN VIEKVHQSAI EISKNRGVLL SEFKIINQDP
   401 PALSDKSVIS AMEFAAKQLN LEYKLMISRA YHDSLFMARI SPMGMIFIPC
   451 YKGYSHKPEE YASPEDMANG VKVLALAMAR LSLQ
```

Mancha 4901 Serina/treonina Quinasa putativa asociada a pared; BAD08905.1

Porcentaje de la secuencia cubierto: 23%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
MESAESHRSW RRRRSDRDAV GAQPAGARHG TSARFDSPAD GIYAAAARFN
    51 VRNRDSAPFL AAIPLILSYN IALPGCTDTC GNTTIPYPFG IGDERCFREG
   101 FKLVCDPAYD PPKLFMNGPG YEVHKIKLAR RVLHLDTGIT QMLGGDSYNQ
   151 KWILDLDDKL FRVSADMNVF ITLGCGFHFF IGSSPAAAGD NATSSSNCVS
   201 NCRPGYPILA TDGTCYGIGC CNASVVEDHN SYTIKLLSLQ SSPRAVPFNA
   251 SMVVVKGEWW RRADNAMLLQ QEVLSRLGAI AGAPDAARNV GVRTVVNWML
   301 GNSSCVEAKK LSDFGCLSDN SECFDGPAGR GYACKCRSGY DGNPYMPNGC
   351 QGLIIGIGLG GSLIIVVLIL TGIVVRRKFK SRRAKKLKEF FFKQNRGLLL
   401 HQLVDKDIAE RMIFSLEELE KATNNFDESR KLGGGGHGTV YKGILSDQRV
   451 VAIKKSRYAI KREIDGFINE VAILSQVNHR NVVKLFGCCL ETEVPLLVYE
   501 FIPNGTLHEY LHVNSAQSVP WKERLRIALE IARSLAYLHS AASVSIIHRD
   551 IKTTNILLDD RFIAKVSDFG ASRGIPIDQN IVTTTIQGTF GYLDPEYYRK
   601 SRLTEKSDVY SFGVILAELI TRRRPTSYIS PEGFNLTEQF ILLVSEDRLL
   651 EIVDSQITKE QGEEEAREVA EIAVMCLNLK GEDRPTMRQV EVKLEGLQGA
701 VNTIRGRRAV QLNSPLTEES DSNIVAVGDA GYHNSSRRLS MEEEFWSSMS
751 FPR
```

Blast
Homología a la familia de proteínas Serina/treonina Quinasa putativa asociada a pared en Blastp

Mancha 4902 ATPasa V-tipo protón subunidad B 2; gi|2493132

Porcentaje de la secuencia cubierto: 72%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1MAPEMEEGTL EIGMEYRTVS GVAGPLVILD KVKGPKYQEI VNIRLGDGTT
    51 RRGQVLEVDG EKAVVQVFEG TSGIDNKYTT VQFTGEVLKT PVSLDMLGRI
   101 FNGSGKPIDN GPPILPEAYL DISGSSINPS ERTYPEEMIQ TGISTIDVMN
   151 SIARGQKIPL FSAAGLPHNE IAAQICRQAG LVKRLEQSKH AAEGGEEDNF
   201 AIVFAAMGVN METAQFFKRD FEENGSMERV TLFLNLANDP TIERIITPRI
   251 ALTTAEYLAY ECGKHVLVIL TDMSSYADAL REVSAAREEV PGRRGYPGYM
   301 YTDLATIYER AGRIEGRKGS ITQIPILTMP NDDITHPTPD LTGYITEGQI
   351 YIDRQLHNRQ IYPPINVLPS LSRLMKSAIG EGMTRRDHSD VSNQLYANYA
   401 IGKDVQAMKA VVGEEALSSE DLLYLEFLDK FERKFVAQGA YDTRNIFQSL
   451 DLAWTLLRIF PRELLHRIPA KTLDQFYSRD ATH
```

Mancha 5403 ACC oxidasa; BAA37133.1

Porcentaje de la secuencia cubierto: 39%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1 VLNHGIPNEF MDTVERMTKA HYNKCMEQRF NELVASKALE GVQVELKDMD
   51 WESTFYIRHL PESNIAEIPD LDDEYRKVMK DFAAKLEKLA EELLDLFCEN
  101 LGLEKGYLKK ALYGSRGPTF GSKVSNYPPC PKPELVKGLR PHTDAGGIVL
  151 LFQDGKVGGL QLLKDGQWVD VPPIPHAIVI NIGDQLEVIT NGKYKSVDHR
  201 VVAQTDGARM SLASFFNPGS DAVIYPAPAL VEKEAEEKKQ LYPKFVFEDY
  251 MKIYAGLKFH A
```

Mancha 5705 ACC oxidasa; BAA37133.1
Porcentaje de la secuencia cubierto: 34%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1 VLNHGIPNEF MDTVERMTKA HYNKCMEQRF NELVASKALE GVQVELKDMD
   51 WESTFYIRHL PESNIAEIPD LDDEYRKVMK DFAAKLEKLA EELLDLFCEN
  101 LGLEKGYLKK ALYGSRGPTF GSKVSNYPPC PKPELVKGLR PHTDAGGIVL
  151 LFQDGKVGGL QLLKDGQWVD VPPIPHAIVI NIGDQLEVIT NGKYKSVDHR
  201 VVAQTDGARM SLASFFNPGS DAVIYPAPAL VEKEAEEKKQ LYPKFVFEDY
  251 MKIYAGLKFH A
```

Mancha 5706 Proteína hipotética CHLNCDRAFT_36787; gi|552816913

Porcentaje de la secuencia cubierto: 34%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1MAATTVALSA QTVVAGSSRS VSSLARRGPL FRPLAALASG PQGGSTQGAL
   51 RQALGLRTDA RRQARVAVAT VEPDLEEEQP AAVLGRVPLA AVAANLEAVL
  101 PQADGSLLGE SDIEEELLGD APEGFSRSPR SFASLFTDDE AEEAAVVDPS
  151 LLLVNCGLSE GSVRALEERG ITSLFPIQKT VFEPAMRGAD LIARAKTGSG
  201 KTLAFAIPII EKIMAGPRNL RKPQCLVLAP TRELAKQVER EIAATAPGLG
  251 CGCYYGGNPI GPQLKELRRG VDIVVGTPGR IIDLIDQDAL DLSMVRFVVL
  301 DEADQMLNVG FEKDVETILE NVPQERQTML FSATLPRWVK KLVKQYLNNP
  351 ENIDLVGEGN TGQDPDSITA LAVPADARRS VLVDLLTVYG EGGKAIVFTQ
  401 TKREADEVAA SVGGHLPCGA LHGDMSQRER EKVLASFRAN KLMVLVATDV
  451 AARGLDIPDV DVVVHYELPQ DPESFLHRSG RTGRAGKSGT AIAMFQPKEI
  501 GYFKRILRET EVQGVKLITA PSPTQVIEAA AKQVMYRLDG VDAEVRKYFT
  551 PVAKMLLSSR DPQEALEAAL AALSGIQEVP EPRSLLTMEE GIQTLQMMSK
  601 PGRITRPAHV SGIVGKLLEG TAFNAGAVGR IRMLEEEGQC GAAFDVPMDL
  651 GREIMARVDE LHKRGVSLTV PESLPAEEDL YQMGRYGSR
```

Mancha 5903 Dihidrolipoillisina-residuo acetiltransferasa componente 3 de complejo piruvatodehidrogenasa, mitocondrial 84% de homología en Blast; EMT27967.1

Porcentaje de la secuencia cubierto: 24%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1 MTEGNIARWV KKEGDKVSPG EVLCEVETDK ATVEMECMEE GYLAKIIHGD
   51 GAKEIKVGEI IAVTVEEEED IGKFKDYKAP SSAESAAPAE SKPQSEPTEP
  101 KKEKEQPKAP EPKATKTEES FLSEDRTFSS PIARKLAEDN NVPLSSIKGT
  151 GPDGRILKAD IEDYLASVAK GAKKETAAAP GLGYVDLPNT QIRKVTANRL
  201 LHSKQTIPHY YLTVDTRVDK LIKLRSELNP LQDTSGGKKI SINDLVIKAA
  251 ALALRNVPEC NSSWMNDFIR QYHNVNINVA VQTEDGLFVP VIRDADKKGL
  301 ATIADEVKQL AQRARDNSLK PEDYEGGTFT VSNLGGPFGI KQFCAIVNPP
  351 QSAILAIGSA EKRVIPGAEG QFEVGSFMSA TLSCDHRVID GAIGAEWMKA
  401 FKGYIENPTT MLL
```

Blast
Homología del 84% a la familia de Dihidrolipoillisina-residuo acetil transferasa componente 3 de complejo piruvato dehidrogenasa, mitocondrial asociada a pared en Blastp

Mancha 5904 Proteína de choque termincocitosolica 70; AAB97316.1

Porcentaje de la secuencia cubierto: 34%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1 MSGKGEGPAI GIDLGTTYSC VGVWQHDRVE IIANDQGNRT TPSYVAFTDS
   51 ERLIGDAAKN QVAMNPINTV FDAKRLIGRR FSDASVQSDM KLWPFKVIPG
  101 AGDKPMIVVS YKGEDKEFAA EEISSMVLIK MREIAEAFLG LTIKNAVVTV
  151 PAYFNDSQRQ ATKDAGVIAG LNVMRIINEP TAAAIAYGLD KKATSVGEKN
  201 VLIFDLGGGT FDVSLLTIEE GIFEVKATAG DTHLGGEDFD NRMVNHFVQE
  251 FKRKHKKDIS GNPRALRRLR TSCERAKRTL SSTAQTTIEI DSLFEGVDFY
  301 TTITRARFEE LNMDLFRKCM EPVEKCLRDA KMDKSTVHDV VLVGGSTRIP
  351 KVQQLLQDFF NGKELCKSIN PDEAVAYGAA VQAAILSGEG NEKVQDLLLL
  401 DVTPLSLGLE TAGGVMTVLI PRNTTIPTKK EQVFSTYSDN QPGVLIQVYE
  451 GERTRTRDNN LLGKFELSGI PPAPRGVPQI TVCFDIDANG ILNVSAEDKT
  501 TGQKNKITIT NDKGRLSKEE IEKMVQEAEK YKSEDEEHKK KVESKNALEN
  551 YAYNMRNTVK DEKISSKISE ADKKKIEESI DNAINWLESN QLAEADEFED
  601 KMKELESICN PIIAKMYQGA GGEAGGVPMD DDEVPSAGAS SGPGPKIEEV
  651 D
```

Mancha 6401 Enolasa; CAA41116.1

Porcentaje de la secuencia cubierto: 29%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1 LGANAILAVS LAVCKAGAAV KKIPLYKHIA NLAGNKKLVL PVPAFNVING
   51 GSHAGNKLAM QEFMILPVGA SSFKEAMKMG CEVYHHLKAV IKKKYGQDAT
  101 NVGDEGGFAP NIQENKEGLE LLKTAIEKAG YTGKVVIGMD VAASEFYGKD
  151 KTYDLNFKEE NNNGSQKISG DQLKDLYKSF VSEYPIVSIE DPFDQDDWET
  201 YAKLTAEIGQ KVQIVGDDLL VTNPKRVAKA ISEKTCNALL LKVNQIGSVT
  251 ESIEAVKMSK QAGWGVMTSH RSGETEDTFI ADLAVGLSTG QIKTGAPCRS
  301 ERLAKYNQLL RIEEELGSDA VYAGAS
```

Mancha 6501 Proteína homologa relacionada al ácido abscísico y estrés por maduración; AAB97140.1

Porcentaje de la secuencia cubierto: 23%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1 MSEEKHHHGL FHHHKDEDRP IETSDYPQSG GYSDEGRTGS GYGGGGGGYG
   51 GGGGYGDGGG GYGDNTAYSG EGRPGSGYGG GGGYGESADY SDGGRYKETA
  101 AYGTTGTNES EIDYKKEEKH HKHLEHLSEP GAAAAGVFAL HEKHESKKDP
  151 EHAHKHKIEE EIAAAAAVGS GGFAFHEHHE KKEAKEEEEE SHGKKHHHLF
  201
```

Mancha 6905 Vacuolar H+-ATPasa A1 subunidad isoforma; NP_001234281.1

Porcentaje de la secuencia cubierto: 33%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1 MPSIVGGPMT TFEDSEKESE YGYVRKVSGP VVVADGMGGA AMYELVRVGH
   51 DNLIGEIIRL EGDSATIQVY EETAGLMVND PVLRTHKPLS VELGPGILGN
  101 IFDGIQRPLK TIAKRSGDVY IPRGVSVPAL DKDILWEFQP KKIGEGDLLT
  151 GGDLYATVFE NSLMEHRVAL PPDAMGKITY IAPAGQYSLN DTVLELEFQG
  201 VKKQVTMLQT WPVRSPRPVA SKLAADTPLL TGQRVLDALF PSVLGGTCAI
  251 PGAFGCGKTV ISQALSKYSN SDTVVYVGCG ERGNEMAEVL MDFPQLTMTL
  301 PDGREESVMK RTTLVANTSN MPVAAREASI YTGITIAEYF RDMGYNVSMM
  351 ADSTSRWAEA LREISGRLAE MPADSGYPAY LAARLASFYE RAGKVKCLGG
  401 PERTGSVTIV GAVSPPGGDF SDPVTSATLG IVQVFWGLDK KLAQRKHFPS
  451 VNWLISYSKY SGALESFYEK FDPDFINIRT KAREVLQRED DLNEIVQLVG
  501 KDALAETDKI TLETAKLLRE DYLAQNAFTP YDKFCPFYKS VWMLRNIIHF
  551 YNLANQAVER GAGMDGQKIT YTLIKHRLGD LFYRLVSQKF EDPAEGEDVL
  601 VGKFQKLHDD LVAGFRNLED ETR
```

Mancha 5608 Proteína predicha; BAJ90220.1

Porcentaje de la secuencia cubierto: 32%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1PILFPWTTTP VTPRRRRDLP PPAATGAPSS RDMAASPTSS RSVTETVNGS
   51 HRFVIQGYSL AKGMGVGKHI ASETFTVGGY QWAIYFYPDG KNPEDNSAYV
  101 SVFIALASEG TDVRALFELT LQDQSGKGKH KIHSHFDRSL ESGPYTLKYR
  151 GSMWGYKRFF RRTALETSDF LKDDCLKINC TVGVVVSTID YSRSHSIQVP
  201 DSDIGYHFGS LLDSNEGVDV ILNVSGERFH AHKLVLAARS TVFRSKLFDD
  251 ESEGEKNEVN ESEDLEEIVI DDMEPKVFKA MLHFIYRDTL VNDYELDASS
  301 SMGSIFDTLA AKLLAAADKY DLGRLRLLCE SYLCKDISVA SVASTLALAD
  351 SHHAMELKAV CLKFAAENLS AVIRTDGFDY LKDTCPSLQS EILRTVAGCE
  401 EPCSSGGKSQ SVWGQLSDGG DTSGRRVRPR I
```

Mancha 5503 Proteína de la familia Ribosa- fosfato priofosfoquinasa 4; XP_002300881.1

Porcentaje de la secuencia cubierto: 27%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1 MEVDKVETQQ QQQKQKQVHL FYCVESEELA RNVAAHSELI TLQSINWRNF
   51 DDGFPNLFIN NAENLRGQHV AFLASFSSPG VIFEQLSVIY ALPRLFVASF
  101 SLVLPFFPTG SFERMEEEGD VATAFTMARI LSNIPISRGG PTSLVIYDIH
  151 ALQERFYFGD HVLPLFVTGI PLLKQRLHQL PESDKIVVAF PDDGAWKRFH
  201 KLLDHFPMVV CAKVREGDKR IVRIKEGNPA GCHVVIVDDL VQSGGTLIEC
  251 QKVLAAHGAA KVSAYVTHGV FPKRSWERFT HKDNGMENAF AYFWITDSCP
  301 HTVKAITNKP PFEVLSLAGS IADALQI
```

Mancha 2402 Glutamina sintetasa PR-2; P04771.1

Porcentaje de la secuencia cubierto: 7%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1 MSLLSDLINL NLSESTEKII AEYIWVGGSG MDLRSKARTL PGPVDDPAKL
   51 PKWNYDGSST DQAPGDDSEV ILYPQAIFKD PFRRGNNILV ICDVYTPAGE
  101 PLPTNKRYDA AKIFSHPDVV AEVPWYGIEQ EYTLLQKDVN WPLGWPLGGY
  151 PGPQGPYYCG VGADKAYGRD IVDAHYKACV YAGINISGIN GEVMPGQWEF
  201 QVGPSVGISA GDEVWAARYI LERITELAGA VVSFDPKPIP GDWNGAGAHS
  251 NYSTKSMREE GGYEVIKKAI EKLGLRHKEH IAAYGKGNER RLTGRHETAD
  301 INTFSWGVAN RGSSVRVGRD TEKQGKGYFE DRRPASNMDP YVVTSMIAET
  351 TILWKP
```

Mancha 6501

Porcentaje de la secuencia cubierto: 32%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1 MAVAPTRIGL AGLAVMGQNL ALNIAEKGFP ISVYNRTTSK VDETVERAKR
   51 EGNLPVYGFH DPESFVNSIQ KPRVIIMLVK AGAPVDQTIK TLSAYMEEGD
  101 CIIDGGNEWY ENTERREKAV TEQGLLYLGM GVSGGEEGAR NGPSLMPGGS
  151 YEAYKYIEDI LLKVAAQVPD SGPCVTYIGK GGSGNFVKMV HNGIEYGDMQ
  201 LIAEAYDVLK SVGKLSNDEL HTVFSEWNKG ELLSFLIEIT ADIFKIKDDK
  251 GDGYLVDKVL DKTGMKGTGK WTVQQAAELS VPAPTIESSL DARFLSGLKE
  301 ERVQAAKVFK EGGFGDILTD QAVDKKQLID DVRRALYASK ICSYAQGMNL
  351 IRAKSLEKGW GLKLGELARI WKGGCIIRAI FLDRIKQAYD RNPELPNLLV
  401 DPEFAKEIIE RQSAWRRVVS LAINSGISTP GMSASLAYFD SYRRERLPAN
  451 LVQAQRDYFG AHTYERVDMD GAFHTEWFKI AKSMI
```

Mancha 1701 Fosfoenolpiruvatocarboxylasa; CAM83992.1

Porcentaje de la secuencia cubierto: 31%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1 HTDAVDAITT HLGIGSYREW PEERRQEWLV SELRGKRPLF GPELPQSDEV
   51 ADVLGTFRVI AELPGDSFGA YVISMATAPS DVLAVELLQL ECGVKKPLRV
  101 VPLFEKLADL QQARATMELL FSVDWYKGRI NGKQEIMIGY SDSGKDAGRL
  151 SAAWQLYKAQ EEIIGVAERH GVKLTIFHGR GGTVGRGGGP SHLAILSQPP
  201 NTVNGSLRVT VQGEVIEKSF GEENLCFRTL QRFTAATLEH GMNPPVSPKP
  251 EWRRLLDDMA TVSTEEYRSI VFQEPRFVEY FRSATPETEY GRMNIGSRPS
  301 KRKPGGGIES LRAIPWIFAW TQTRFHLPVW LGFGAAFRHA MQQPGGLATL
  351 REMYDEWPFF RVTIDLLEMV FAKGDPRIAA LYDNLLVPQD LWPFGEQLRA
  401 NYAETQSLLL QVAGHDDLLE NDPYLRQRLM LRDSYITA
```

Mancha 2402

Porcentaje de la secuencia cubierto: 31%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1 HTDAVDAITT HLGIGSYREW PEERRQEWLV SELRGKRPLF GPELPQSDEV
   51 ADVLGTFRVI AELPGDSFGA YVISMATAPS DVLAVELLQL ECGVKKPLRV
  101 VPLFEKLADL QQARATMELL FSVDWYKGRI NGKQEIMIGY SDSGKDAGRL
  151 SAAWQLYKAQ EEIIGVAERH GVKLTIFHGR GGTVGRGGGP SHLAILSQPP
  201 NTVNGSLRVT VQGEVIEKSF GEENLCFRTL QRFTAATLEH GMNPPVSPKP
  251 EWRRLLDDMA TVSTEEYRSI VFQEPRFVEY FRSATPETEY GRMNIGSRPS
  301 KRKPGGGIES LRAIPWIFAW TQTRFHLPVW LGFGAAFRHA MQQPGGLATL
  351 REMYDEWPFF RVTIDLLEMV FAKGDPRIAA LYDNLLVPQD LWPFGEQLRA
  401 NYAETQSLLL QVAGHDDLLE NDPYLRQRLM LRDSYITA
```

Mancha 2405 Proteína predicha; XP_001778987.

Porcentaje de la secuencia cubierto: 28%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1 SEDEGSGEYR RGGYHAVRIG DWFHNGRYVV HRKLGWGHFS TVWLAWDTHG
   51 KKYVALKVQK SAQHYTEAAQ DEITILKQIA EGDPGDCRGV VKLLDHFKHT
  101 GPNGTHVCMV FEYLGDNLLT LIKAYNYRGL PLHMVKQLAR EILIGLDYLH
  151 RQLSIIHTDL KPENVLLFSP LDPTKDPRNS DYVPPVFPSP GEKPQTPSRV
  201 DKAPPPSLSK NQKKKAKRNA KKASGNGNDR ERENADMDSR DGSGDVCDEQ
  251 SNAKEEDPPS VSDAPKSGRI SSLSEDLSRL DLRCKIVDLG NACWTYKQFT
  301 ADIQTRQYRC PEVLLGSKYS TPADIWSFAC IVFELATGDV LFDPRSGDDF
  351 DRDEDHLALM MELLGRMPRK VALSGRHSRD YFNRHGDLRH IRRLQYWPLD
  401 NVLIEKYDFS EQDAQEFADF LVPLLDFNPD KRPTAGPCLQ HSWLGS
```

Mancha 2702 Proteína Aconitasa; ADZ57218.1

Porcentaje de la secuencia cubierto: 15%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1 KPGGGEFGKF YRLPALNDPR IDKLPYSIRI LLESAIRNCD NFQVKKEDVE
   51 KIIDWENTSP KLVEIPFKPA RVLLQDFTGV PAVVDLACMR DAMNKLGSDS
  101 NKINPLVPVD LVIDHSVQVD VTRSENAVQA NMELEFQRNK ERFAFLKWGS
  151 TAFHNMLVVP PGSGIVHQVN LEYLGRVVFN TDGILYPDSV VGTDSHTTMI
  201 DGLGVAGWGV GGIEAEAAML GQPMSMVLPG VVGFKLSGKL HNGVTATDLV
  251 LTVTQMLRKH GVVGKFVEFY GDGMGELSLA DRATIANMSP EYGATMGFFP
  301 VDHVTLQYLK LTGRSDETVS MIEGYLRANK MFVDYNEPQQ ERVYSSYLEL
  351 NLAEVEPCIS GPKRPHDRVP LKEMKADWHS CLDNKVGFKG FAVPKEAQEK
  401 VAKFSFHGQP AELKHGSVVI AAITSCTNTS NPSVMLGAGL VAKKACELGL
  451 QVKPWIKTSL APGSGVVTKY LLQSGLQEYL NQQGFHIVGY GCTTCIGNSG
  501 ELDESVASAI SENDVVAAAV LSGNRNFEGR VHPLTRANYL ASPPLVVAYA
  551 LAGTVDIDFE KEPIGTGKDG KSVYLRDIWP STEEIAEAVQ SSVLPNMFRS
  601 TYEAITTGNP MWNHLSVPTD TLYSWDPNST YIHEPPYFKN MTMDPPGTHG
  651 VKDAYCLLNF GDSITTDHIS PAGSIHKDSP AARYLMERGV ERKDFNSYGS
  701 RRGNDEVMAR GTFANIRLVN KLLNGEVGPQ TVHVPTGEKL FVFDAAQRYK
  751 DAGHDTIILA GAEYGSGSSR DWAAKGPMLL GVKAVIAKSF ERIHRSNLVG
  801 MGIIPLCFKA GEDADTLGLT GHERYTIDLP NSISEIRPGQ DVTVTTDTGK
  851 SFTCTVRFDT EVELAYFNHG GILPYVIRNL IEQ
```

Mancha 2806 Gliceraldehide-3-dehidrogenasa subunidad C; NP_001237544.1

Porcentaje de la secuencia cubierto: 39%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

```
1 MGKVKIGING FGRIGRLVAR VALQRDDVEL VAVNDPFITT DYMTYMFKYD
   51 SVHGHWKHHD VTVKDEKTLL FGDKAVTVFG HRNPEEIPWG STGADIIVES
  101 TGVFTDKDKA AAHLKGGAKK VIISAPSKDA PMFVVGVNEH EYKPELDIIS
  151 NASCTTNCLA PLAKVINDRF GIVEGLMTTV HSITATQKTV DGPSAKDWRG
  201 GRAASFNIIP SSTGAAKAVG KVLPALNGKL TGMAFRVPTV DVSVVDLTVR
  251 LEKEASYDEI KNAIKEESEG KLKGILGYTE DDVVSTDFIG DSRSSIFDAK
```

301 AGIALNKNFV KLVSWYDNEW GYSSRVIDLL VFVAKKSL

Mancha 5606 Proteína Rab; AEG74033.1

Porcentaje de la secuencia cubierto: 42%
Péptidos coincidentes se muestran en rojo

1 MAYRSDDDYD YLFK**VVLIGD SGVGKSNLLS RFTRNEFSLE SK**STIGVEFA
51 TRSINVDSKL IKAQIWDTAG QERYR**AITSA YYRGAVGALL VYDITRHVTF**
101 **ENVERWLK**EL KDHTDSNIVV MLVGNKSVLR **HLRAVSADDG QSFSEK**EGLF
151 FMETSALEST NVENAFKQIP TQIYRVVSK**K ALDVGEDPSA VPGK**GQTISV
201 GNKDDVTATK KVGCCSA