

7. AVANCES EN LA AUTENTIFICACIÓN DE CEREZAS DEL JERTE

*Manuel Joaquín Serradilla Sánchez
M^a de Guía Córdoba Ramos
Emilio Aranda Medina
Rocío Casquete Palencia*

1. INTRODUCCIÓN

El cerezo es uno de los frutales de hueso más representativos de Extremadura. Su cultivo se localiza principalmente en el Valle del Jerte, donde se ha caracterizado por ser un cultivo tradicional. Fue introducido por los árabes y, tras la Reconquista, los nuevos colonos lo encontraron perfectamente adaptado a estas tierras. Pero no es hasta el siglo XIV cuando se encuentran las primeras pruebas fehacientes de su presencia en el Valle del Jerte. En las primeras décadas del siglo XIX los cronistas de la época indican que lo mejor de la zona “son las cerezas que son muy estimadas en la Corte...”. Además, hay que destacar también el valor social y estratégico del cultivo para el Valle del Jerte, donde representa la principal fuente de ingresos.

En la provincia de Cáceres, el Valle del Jerte y otras zonas de montaña dedican cerca de 7.442 ha al cultivo del cerezo, con una producción que puede alcanzar los 24,8 millones de kg. La producción de cerezas en el Valle del Jerte se orienta hacia variedades dulces para consumo en fresco. La pequeña cantidad destinada a la industria se utiliza para la elaboración de aguardientes, licor y mermelada de cereza, o se exporta para hacer bombones.

La producción de cerezas de Extremadura supone el 30% de la producción nacional, y el 99% de esta producción se localiza en la provincia de Cáceres (figura 1). Detrás de Extremadura está Aragón, con un 26% de la producción nacional, lo que supone que más de la mitad de la producción nacional se concentra en estas dos comunidades autónomas. Otras comunidades autónomas importantes son Andalucía, Cataluña, Castilla y León, Galicia y la Comunidad Valenciana (MARM, 2007).

La importancia económica de este cultivo a nivel nacional se encuentra por encima de los 100 millones de euros, alcanzando su máximo en el año 2004 con 195 millones de euros (MARM, 2007). A nivel mundial, los principales productores de cerezas son: la Unión Europea, Estados Unidos, Turquía e Irán.

FIGURA 1: Plantación de cerezos en el término municipal de Barrado (Cáceres)



2. CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DE LAS CEREZAS TIPO “PICOTAS”

Para proteger la calidad de las cerezas tipo “Picotas”, el 1 de febrero de 1997 se creó el Reglamento de la *Denominación de Origen “Cereza del Jerte”* que actualmente está ratificado por la Orden APA/148/2003 del 17 de enero. La zona de producción de las cerezas amparadas por la Denominación de Origen Protegida “Cereza del Jerte” está constituida por los 26 términos municipales de la provincia de Cáceres que se relacionan a continuación: Aldeanueva de La Vera, Arroyomolinos de La Vera, Barrado, Cabezabellosa, Cabezuela del Valle, Cabrero, Casas del Castañar, Casas del Monte, Cuacos de Yuste, El Tomo, Garganta la Olla, Gargantilla, Gargüera, Guijo de Santa Bárbara, Hervás, Jaraíz de La Vera, Jarilla, Jerte, Navaconcejo, Pasarón de La Vera, Piornal, Rebollar, Segura de Toro, Tornavacas, Torremenga y Valdestillas. Dentro de las superficies inscritas en la DOP, la mayor parte se encuentra en la zona del Jerte con un 72%; le sigue la zona de la Vera con un 21% y, por último, la zona del Ambroz con 7% (Reglamento DOP “Cerezas del Jerte”).

Las variedades de cerezas amparadas por la Denominación de Origen Protegida pertenecerán a los tipos variedades siguientes:

- a) *Picotas: Ambrunés, Pico Negro, Pico Colorado y Pico Limón Negro.*
- b) *Con pedúnculo: Navalinda.*

En cuanto a las variedades incluidas en la DOP, la variedad ‘Ambrunés’ tiene un total de 130.575 árboles, con una producción de 4.091.130 kg, la mayoría clasificadas

dentro de la categoría Extra. ‘Pico Colorado’ con un total de 26.200 árboles y con una producción de 466.934 kg, siendo en su mayoría de la categoría Primera. La variedad ‘Pico Negro’ con un total de 37.269 árboles y una producción de 319.065 kg siendo en su mayoría de categoría Primera. La variedad ‘Pico Limón Negro’ con 3.943 árboles y con una producción de 95.577 kg en su mayoría de categoría Primera (Reglamento DOP “Cerezas del Jerte”). Por último, la variedad ‘Navalinda’ con un total de 35.926 árboles y una producción de 216.497 kg en su mayoría perteneciente a la categoría Primera.

Respecto a sus características de calidad, se puede decir que la variedad ‘Ambrunés’ se caracteriza por tener un color de la epidermis rojo-vinoso o púrpura (figura 2), gran firmeza de la pulpa, crujiente, dulce y con abundante jugo. Mientras que, las variedades ‘Pico Negro’ y ‘Pico Limón Negro’ presentan un color de la epidermis púrpura-negro (figura 2), gran firmeza de la pulpa y sobre todo se caracterizan por tener una gran astringencia debido a que estas variedades presentan un alto contenido en compuestos fenólicos. Además, dentro del grupo de las “Picotas”, la variedad ‘Pico Colorado’ se caracteriza por presentar un color rojo-anaranjado típico de esta variedad y que la hace fácilmente reconocible (figura 2). La variedad ‘Pico Colorado’, dentro de las “Picotas”, es la más que presenta un sabor más dulce, debido a que probablemente a que al ser la más tardía hace que se sintetice mayor contenido de azúcares. Por último, la variedad ‘Navalinda’ es la variedad más temprana amparada bajo la DOP “Cereza del Jerte”. Esta variedad posee un color rojo vinoso y unas características organolépticas buenas.

FIGURA 2: Variedad de cereza ‘Ambrunés’ (A), ‘Pico Negro’ (B) y ‘Pico Colorado’ (C)



El Reglamento contempla que las cerezas tendrán que reunir una serie de características mínimas, deben estar enteras, sanas, limpias y con aspecto fresco, prácticamente exentas de materias extrañas visibles, exentas de olores o sabores extraños y humedad exterior anormal. Se excluirán los productos atacados de podredumbre o de alteraciones que los hagan impropios para el consumo. Los frutos tendrán que recolectarse de forma tradicional, es decir, a mano, con el fin de evitar daños. Presentarán un desarrollo apropiado a su calidad y su estado, en especial el grado de maduración, que permita soportar el transporte y acondicionamiento para asegurar su llegada a destino en condiciones satisfactorias. Las cerezas de calibre igual o superior a 21 milímetros y que reúnan las características de la categoría extra, definidas en el Reglamento (CEE) número 899/87 de la Comisión, de 30 de marzo de 1987, por el que se fijan las normas de calidad para las cerezas, podrán ser amparadas por la Denominación de Origen Protegida.

Las “Picotas” a nivel nacional son muy apreciadas por los consumidores, debido a que tienen una textura inconfundible, que proporciona un crujir único en la boca. Además,

se diferencian del resto de variedades por tener un equilibrio azúcares/acidez muy bueno proporcionando un sabor único. Estas características han hecho que en muchas zonas en las que no se pueden producir cerezas “Picotas” utilicen técnicas fraudulentas, que consisten en desrabar cerezas con pedúnculo, y venderlas como cerezas tipo “Picotas”. Entre las cerezas con pedúnculo que se suelen utilizar para desrabar, una de más usadas es la variedad ‘Sweetheart’. Esta variedad se caracteriza por tener la misma fecha de maduración que las variedades “Picotas” y además presentar un color de la epidermis muy parecido. Todas estas características hacen que sea una variedad idónea para el desrabe. Además, otro problema asociado al desrabe es la pérdida de calidad del fruto, debido a que en la inserción del pedúnculo al fruto se produce una abertura que hace que estas cerezas se deterioren antes, mientras que en las variedades “Picotas” esta abertura cicatriza y por tanto, no se produce ningún deterioro.

En este contexto, son pocos los métodos que van a permitir diferenciar de forma rápida este posible fraude. Las medidas del tamaño de fruto, color de piel y, sobre todo, el sabor y textura característico de las cerezas tipo “Picotas”, son técnicas usadas para clasificar por calidad, pero son medidas poco precisas, muy subjetivas y por tanto, poco fiables para detectar frutos desrabados. Al Consejo Regulador de la Denominación de Origen Protegida le interesa buscar técnicas novedosas que permitan detectar esta práctica fraudulenta de forma rápida, buscando siempre poder ofrecer cerezas del Jerte de elevada calidad. En base a esto, es importante introducir nuevos métodos de control rápidos y exhaustivos que permitan detectar la venta de frutos de otras variedades, no amparados por la DOP, como cerezas del Jerte.

3. CARACTERIZACIÓN DE VARIEDADES DE CEREZA TIPO “PICOTAS”

En el presente trabajo se han utilizado diferentes técnicas analíticas que han permitido, de una manera objetiva, diferenciar variedades de cerezas a partir de los frutos seleccionados de las variedades tipo “Picotas”: “*Ambrunés*”, “*Pico Negro*” y “*Pico Colorado*”, así como de la variedad “*Sweetheart*”.

3.1. Técnicas de análisis de perfiles de proteínas

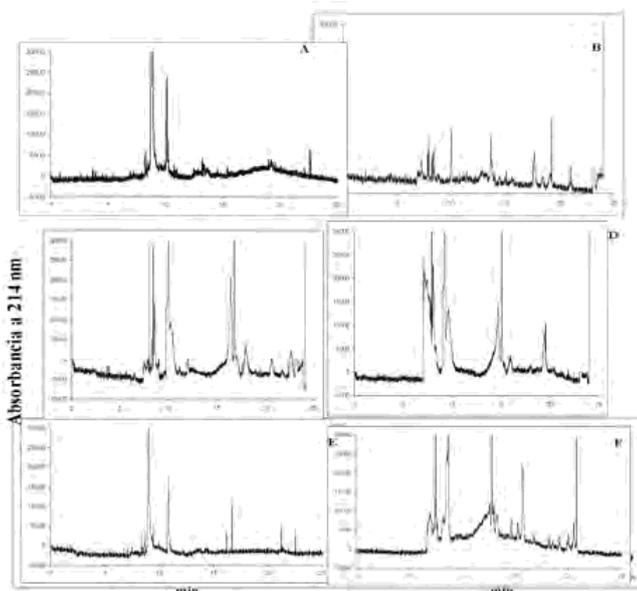
Las proteínas se caracterizan por ser unos productos directos de la traducción y transcripción de los genes, lo cual las convierte en unos elementos ideales para la identificación de variedades dentro del reino de las plantas. Existen varios métodos analíticos para el estudio de los perfiles proteicos, pero hoy en día los más empleados para encontrar diferencias entre vegetales son los métodos electroforéticos, y dentro de estos, podemos encontrar los basados en geles de poliacrilamida o en capilares de sílice. Relacionados con la electroforesis en gel, existen dos tipos; las no desnaturizantes, donde la separación de las proteínas se produce en base a su carga y tamaño o configuración molecular, o bien por su punto isoeléctrico. El otro tipo es la desnaturizante en donde la separación es exclusivamente en base al tamaño de las subunidades.

En cuanto a las electroforesis en geles desnaturalizantes hablaremos de la SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico). La SDS-PAGE es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de perfiles proteicos, mostrándose como una herramienta útil para la discriminación entre variedades de cultivos como avena y otros cereales (Becerra y Paredes, 2000; Cooke, 1992), así como la caracterización de variedades de *Capsicum annuum* (Luchese *et al.*, 1999; Anu y Peter, 2003).

Por su parte, el uso de la electroforesis capilar en zona (ECZ) presenta claras ventajas con respecto a la técnica en gel como son su capacidad de análisis rápido, su elevada eficiencia y resolución en los perfiles proteicos obtenidos (Manabe, 1999). En particular, en la ECZ se separan especies iónicas, inyectándolas en un capilar relleno de un tampón en base a la diferencia en la movilidad electroforética o a la densidad de la carga. Esta técnica ha sido aplicada con éxito para la resolución de mezclas complejas de proteínas como la diferenciación específica del género *Vicia* (Piergiovanni y Taranto; 2005). Además, proteínas de diferentes fracciones de cereales han sido separadas, obteniendo diferentes perfiles proteicos en las fracciones de prolaminas, glutelinas y gliadinas para distintos genotipos de cereales (Yan *et al.*, 1999; Bean *et al.*, 2.000). También para la caracterización de pimentones, la ECZ ha resultado adecuada para la detección de bajos porcentajes de mezcla entre variedades reconocidas y no reconocidas por la DOP “Pimentón de la Vera” (Hernández *et al.*, 2006).

Se ensayó la extracción de las diferentes fracciones proteicas con diferentes disolventes como: agua desionizada, acetona, cloroformo, metanol y detergente Tritón X-114 obteniéndose distintas resoluciones en la electroforesis capilar (Serradilla *et al.*, 2008a). Se comprobó que con los extractos obtenidos con acetona, precipitado del metanol y cloroformo se obtenían pocos picos, mientras que en el resto de extractos se observan un mayor número de picos (figura 3).

FIGURA 3: Electroferogramas según protocolo de extracción: A: Extracción con acetona; B: Extracción con cloroformo; C: Extracción con agua; D: Extracción con Triton X-114; E: Precipitado de Extracción con metanol; F: Extracción con metanol evaporado con nitrógeno

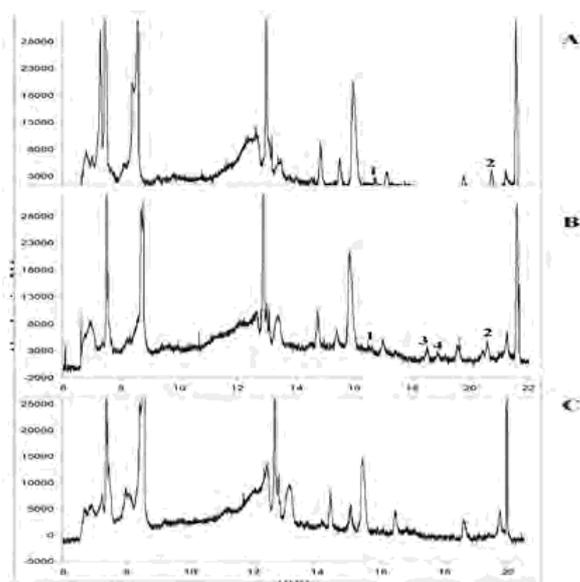


No obstante, el mejor resultado se obtuvo con las proteínas solubles en metanol y, dentro de éstas, el sobrenadante evaporado con nitrógeno fue el que dio el mejor resultado, concretamente por su menor tiempo de carrera y un mayor número de picos (figura 3). Esta misma fracción permitió la identificación de mezclas fraudulentas de pimentones a niveles inferiores al 20% en todas las mezclas realizadas, llegando a niveles de detección del 5% para mezclas de pimentones elaborados con la variedad reconocida Bola y con variedades no reconocidas por la DOP “Pimentón de la Vera”, 7 fue la que dio mejores resultados en el análisis de perfiles proteicos de pimientos deshidratados (Hernández et al., 2006).

Los electroferogramas obtenidos bajo las condiciones optimizadas para cada una de las variedades de cerezas estudiadas se resolvieron en 19 picos, encontrándose diferencias cualitativas y cuantitativas al comparar entre sí las muestras analizadas (figura 4). Así, las variedades tipo “Picotas” presentan los picos 1 y 2 que no pudieron ser detectados en la variedad ‘Sweetheart’, mientras que también se pudo diferenciar entre las dos variedades de “Picotas”, presentando la variedad ‘Pico Negro’ los picos 3 y 4 que no aparecen en la variedad ‘Ambrunés’(figura 4).

Estos resultados muestran como, usando el protocolo de extracción de las proteínas solubles en metanol evaporadas con nitrógeno y analizadas mediante electroforesis capilar en zona, es posible la diferenciación de las variedades de cerezas estudiadas (Serradilla et al., 2008b). Por tanto, este método de análisis mediante electroforesis capilar en zona podría ser utilizado para controlar y detectar las falsificaciones de las cerezas “Picotas” comercializadas bajo denominación de origen “Cereza del Jerte”.

FIGURA 4: Electroferogramas de proteínas solubles en metanol de ‘Ambrunés’, ‘Pico Negro’ y ‘Sweetheart’



3.2. Técnicas basadas en el análisis de ácidos nucleicos

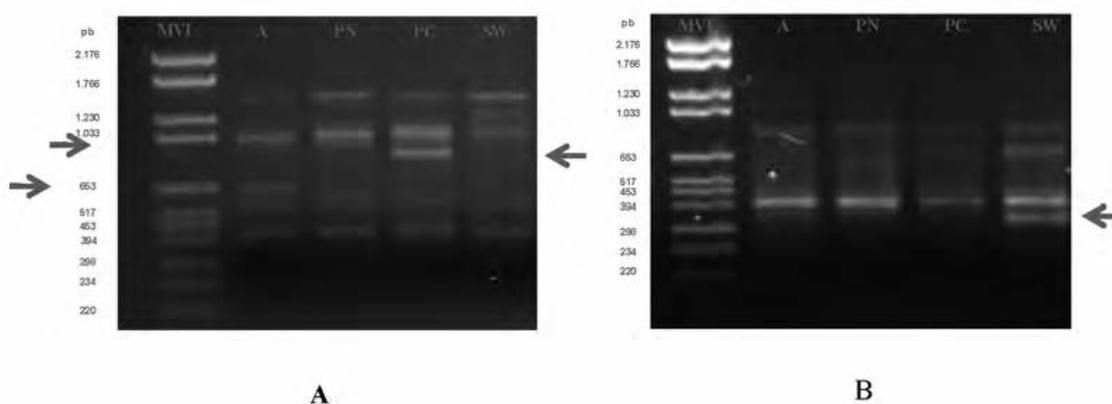
Los marcadores de ADN son usados para diversos propósitos, entre los que se encuentran caracterizar las variedades o cultivares y la discriminación de fraudes alimentarios (Woolfe y Primrose, 2004). Los primeros marcadores de ADN usados en las plantas fueron los denominados polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Beckman y Soller, 1983). El desarrollo de marcadores basados en la PCR (Polymerase Chain Reaction) ha emergido como la mejor herramienta para diversos análisis genéticos. Dentro de estos marcadores se incluyen la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (Random Amplified Polymorphic DNA o RAPD). El uso de técnicas RAPD para identificar variedades o caracterizar la variabilidad genética dentro de un banco de germoplasma del género *Prunus* han sido ampliamente usadas (Baránek et al., 2006 y Cai et al., 2007). Otras técnicas son el empleo de microsatélites, que son repeticiones de secuencias simple o SSRs (Broun y Tanksley, 1996), y que también han sido usados para detectar diferencias genéticas entre especies del género *Prunus* (Wünsch et al., 2002), secuencias entre repeticiones simples-PCR o ISSR-PCR (Zietkiewicz et al., 1994) y el análisis de polimorfismo de los fragmentos de ADN amplificado o AFLP (Amplified Length Polymorphisms) (Vos et al., 1995). Estos métodos basados en la PCR se caracterizan fundamentalmente por su rapidez y sensibilidad para identificar variedades.

En el presente trabajo se ensayaron diferentes técnicas de PCR. Además se puso a punto un protocolo de extracción de ADN a partir del fruto, cereza, dado que en la mayoría de los trabajos estudiados, la extracción de ADN se realiza a partir de yemas u hojas (Wunsch et al., 2002), debido a que la presencia de compuestos fenólicos y azúcares dificulta la obtención de un ADN de elevada calidad. Se utilizaron un total de 27 cebadores de RAPD, muchos de ellos empleados para diferenciar variedades dentro del género *Prunus avium*, L. (Cai et al., 2007) y también se emplearon 3 cebadores ISSR. Con la técnica del RAPD, los mejores resultados se obtuvieron con el cebador OPD11, mientras que con la de ISSR fue con el cebador GCC4. Ambos cebadores permitieron diferenciar las variedades tipo “Picotas” de la variedad ‘Sweetheart’ (figura 4). El cebador OPD11, nos permitió distinguir no sólo las variedades “Picotas” de la ‘Sweetheart’, sino que se observaron perfiles de bandas diferentes entre las tres variedades “Picotas” estudiadas (figura 5a). Así, con este cebador la variedad ‘Ambrunés’ mostró un perfil de bandas con una banda característica de aproximadamente 660 pb de peso molecular, que no estuvo presente en las otras tres variedades (figura 5a). De igual modo, con este mismo cebador para las variedades ‘Pico Negro’ y ‘Pico Colorado’ se generaron perfiles de bandas similares con bandas características de aproximadamente 987 pb y 894 pb, respectivamente (Figura 4a). El análisis de los resultados con la técnica ISSR y el cebador GCC4 mostró perfiles de bandas similares entre las cuatro variedades estudiadas, sin embargo se observaron bandas características en la variedad ‘Sweetheart’ de las tipo “Picotas”, de aproximadamente 325 pb de peso molecular que no estuvo presente en las tres tipo “Picotas” ensayadas (figura 5b).

En conclusión se puede afirmar que tanto con el método puesto a punto para el análisis de perfiles proteicos mediante electroforesis capilar, así como con las técnicas de PCR, RAPD y ISSR se han podido caracterizar las variedades de cerezas estudiadas y por tanto estas técnicas podrían ser utilizadas para controlar y detectar de forma rápida las

falsificaciones de las cerezas “Picotas” comercializadas bajo denominación de origen “Cereza del Jerte”.

FIGURA 5: Geles de agarosas de los productos de amplificación obtenidos con los cebadores OPD 11 (A) y GCC 4 (B) de las variedades Ambrunés (A), Pico Negro (PN), Pico Colorado (PC) y Sweetheart (SW). En el extremo izquierdo de los geles aparece el marcador de peso molecular 2,1-0,07 kpb (MVI).



4. BIBLIOGRAFÍA

- Anu, A. and Peter, K. V. (2003): Analysis of seed protein of 29 lines of *Capsicum annum* L. by polyacrylamide gel electrophoresis. *Genetic Resource and Crop Evolution*, 50, 239-243.
- Baránek, M., Raddová, J., Pidra, M. (2006): Comparative analysis of genetic diversity in *Prunus* L. as revealed by RAPD and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 108, 253-259.
- Bean, S. R., Lookhart, G. L. y Bietz, J. A. (2000): Acetonitrile as a buffer additive for free zone capillary electrophoresis separation and characterization of maize (*mays* L.) and sorghum bicolor L. Moench storage proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 318-327.
- Becerra, V. y Paredes, M. (2000): Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudio de diversidad genética. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA (Chile). Agricultura Técnica*, 60 (3), 270-281.
- Beckmann, J. S. and Soller, M. (1986): Restriction fragment length polymorphism in plant genetic improvement. En: *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*. Miflin, B. J. (Ed.), 3, 197-250.
- Broun, P. y Tanksley, S. D. (1996): Characterisation and genetic mapping of simple sequences in the tomato genome. *Molecular and General Genetic*, 250, 39-49.

- Cai, Y.L., Cao, D.W., Zhao, G.F. (2007): Studies on genetic variation in cherry germplasm using RAPD analysis. *Scientia Horticulturae*, 111, 248-254.
- Cooke, R. J. (1992): Handbook of variety testing. Electrophoresis handbook: Variety identification. *The International Seed Testing Association, Zurich*.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19, 11-15.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Bartolomé, T., Córdoba, M. G. (2006): Detection of smoked paprika “Pimentón de la Vera” adulteration by Free Zone Capillary Electrophoresis (FZCE). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (12), 4141-4147.
- Hormaza, J.I. (1999): Early selection in cherry combining RAPDs with embryo culture. *Scientia Horticulturae*, 79, 121-126.
- Lucchese, C., Dinelli, G., Miggiano, A. y Lovato, A. (1999): Identification of pepper (*Capsicum* spp.) cultivars by field and electrophoresis tests. *Seed Science and Technology*, 27, 37-47.
- Manabe, T. (1999): Capillary electrophoresis of proteins for proteomic studies. *Electrophoresis*, 20, 3116-3121.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (2007): Anuario de Estadística Agraria. Descargado de la web: <http://www.marm.es>
- Piergiovanni, A. R. y Taranto, G. (2005): Specific differentiation in *Vicia* genus by means of capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1069, 253-260.
- Reglamento Denominación de Origen Protegida “Cerezas del Jerte” (2003): Orden APA/148/2003 donde se publica el Reglamento de la Denominación de Origen Protegida de cerezas del Jerte, 1 de enero.
- Serradilla, M.J., Martín, A., Lopez-Corrales, M., Córdoba, M.G. (2008a): Optimización de un protocolo para la identificación de variedades de cereza mediante el análisis de perfiles proteicos por electroforesis capilar en zona (ECZ). *Avances en maduración y post-recolección de frutas y hortalizas*, Acribia (Ed.), 78-83.
- Serradilla, M.J., Martín, A., Aranda, E., Hernández, A., Benito, M.J., Lopez-Corrales, M., Córdoba, M.G. (2008b): Authentication of “Cereza del Jerte” sweet cherry varieties by free zone capillary electrophoresis (FZCE). *Food Chemistry*, 111, 457-461.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. y Zabeau, M. (1995): AFLP, a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.
- Woolfe, M. y Primrose, S. (2004): Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology*, 22 (5), 222-226.
- Wünsch, A. and Hormaza, J.I. (2002): Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences. *Heredity*, 89, 56-63.

- Yan, Y., Surlan-Momirovic, G., Prodanovic, S., Zoric, D. y Liu, G. (1999): Capillary zone electrophoresis analysis of gliadin proteins from Chinese and Yugoslav winter wheat cultivars. *Euphytica*. 105, 197-204.
- Zietkiewicz, E., Rafalksi, A. y Labuda, D. (1994): Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-183.