

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

# FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Evaluación de parámetros fisiológicos e identificación de proteínas asociadas con tolerancia inducida al daño por frío en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Imperial

# **TESIS**

Que presenta

IBQ. MARÍA DE LOURDES VALENZUELA PONCE

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIA

Υ

**TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS** 

**Directores** 

DR. JOSÉ ÁNGEL LÓPEZ VALENZUELA DR. MISAEL ODÍN VEGA GARCÍA El presente trabajo se realizó los Laboratorios de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología y Tecnología Poscosecha de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección del Dr. José Ángel López Valenzuela y el Dr. Misael Odín Vega García, así como la asesoría de la Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo. Contó con financiamiento del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI 2014/114) de la Universidad Autónoma de Sinaloa. La IBQ María de Lourdes Valenzuela Ponce recibió beca de estudios de Maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y beca de terminación de tesis del PROFAPI.



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

## CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de <u>Culiacán de Rosales</u>, <u>Sinaloa</u> el día <u>27</u> del mes <u>enero</u> del año <u>2016</u>, el (la) que suscribe <u>IBQ</u>. <u>María de Lourdes Valenzuela Ponce</u>, alumno (a) del Programa de <u>Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos</u> con número de cuenta <u>0529170-4</u>, de la Unidad Académica <u>Facultad de Ciencias Químico Biológicas</u>, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de <u>Dr. José Ángel López Valenzuela y Dr. Misael Odín Vega García</u> y cede los derechos del trabajo titulado "<u>Evaluación de parámetros fisiológicos e identificación de proteínas asociadas con tolerancia inducida al daño por frío en tomate (<u>Solanum Lycopersicum L</u>) cy <u>Imperial</u>", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.</u>

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

IBQ. María de Lourdes Valenzuela Ponce

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, en especial a la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos por permitirme ser parte de su programa brindándome la oportunidad de alcanzar una de mis metas.

A toda la planta docente de la Maestría de Alimentos por compartir sus conocimientos y experiencias ayudándome a mejorar tanto en el ámbito profesional como personal.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) y Al Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) de la Universidad Autónoma de Sinaloa por el apoyo económico otorgado durante mi estancia en la maestría, así como al financiamiento del proyecto de tesis.

A mis directores de tesis, los Drs. Misael Odin Vega García y José Ángel López Valenzuela, mil gracias por la oportunidad de trabajar con ustedes, por las enseñanzas, la paciencia y el apoyo que me brindaron en todo momento. ¡Muchísimas gracias por creer y confiar en mí!

A la MC. Jeanett Chávez Ontiveros, a la Dr. Karen Pineda Hidalgo y a la Dr. Nancy Yareli Salazar por sus valiosas asesorías, su paciencia, su amistad, por creer en mí, por abrirme las puertas del laboratorio y contribuir en mi desarrollo en el área de la investigación, por toda la ayuda brindada y por el trato tan amable y desinteresado con el que siempre me atendieron, pero sobre todo muchas gracias por siempre estar ahí cuando las necesité. En un párrafo no terminaría de decirles lo mucho que les estoy agradecida. ¡Muchas gracias a las 3, las quiero mucho!

Al laboratorio de Fisiología y Tecnología Poscosecha por toda la ayuda proporcionada, por el trato tan amable que me dieron durante el tiempo que estuve ahí y por las valiosas asesorías otorgadas.

A mis compañeros de generación, la generación 2013: Jorge, Anayanci, María Fernanda, Karen María, Brenda, Ana María, Karla, Ana Luisa, Jennifer y Mariela. Por todos esos momentos que compartimos en clase: cumpleaños, estrés, felicidad, estrés, viajes durante exámenes, estrés, grupos de estudio, estrés, TODO. Muchas gracias por todo ese tiempo brindado.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: María Fernanda, Elthon, Milton, David, Erika, Alejandro, Christian, Rodrigo muchas gracias por toda la ayuda brindada, por siempre sacarme una sonrisa, y por hacer que las horas de trabajo fueran más amenas y muy divertidas, por ustedes le tomé más amor y cariño al laboratorio y a mi trabajo.

A María Fernanda por su hermosa y valiosa amistad, por siempre tener algo que contarme en las mañanas, por esa risa de marmota tan peculiar, por ser una persona desinteresada y siempre ayudar a los demás ¡Muchas gracias Fer! Te quiero muchísimo. Qué sería del laboratorio sin ti.

A mi amiga incondicional Anayanci Luna, por no solo ser mi mejor amiga, sino también mi hermana y confidente, por siempre estar ahí conmigo, por darme su apoyo, su amistad invaluable, su tiempo, sus consejos, por soportarme 10 años seguidos de vernos todos los días, por todo, simplemente gracias. Haberme topado contigo es una de las cosas más maravillosas que me han pasado en la vida. Sabes de sobra lo mucho que te quiero.

A mis tías Isabel, Lourdes y Guadalupe, porque desde que nací han sido como mis mamás, por cuidarme y por brindarme todo el apoyo posible, ustedes han sido parte muy importante de mi desarrollo personal y profesional. Sin ustedes no sería la persona que soy ¡Las quiero mucho!

A mis hermanos Cristina Isabel y José Mario, muchas gracias por todo el amor y apoyo que me han dado, por todos esos momentos que hemos compartido juntos y por siempre estar a mi lado. ¡Hermanos los amo!

A mis padres, María y Mario por haberme dado la vida, gracias a ustedes he llegado hasta aquí a base de muchos sacrificios los cuales han valido la pena. Muchas gracias por ayudarme a cumplir mis metas, mis sueños, por apoyarme incondicionalmente en cada etapa y en la realización de mi proyecto de vida. También gracias por siempre ver por mi y por amarme, ustedes son el principal motor de mi vida, mi motivación a seguir adelante, y a ustedes es a quien les dedico cada uno de mis logros porque es gracias a ustedes que soy la persona que soy ahora. Mamá y papá, muchas gracias, los amo mucho.

A Jorge, por haberme brindado todo su apoyo incondicional desde que lo conocí y durante todo el transcuro de esta etapa de maestría. Llegaste en a mi vida para iluminarla. Estar contigo me ha enseñado a ver la vida de manera diferente. ¡Te amo!

# ÍNDICE

		Pág.
ĺN[	DICE DE FIGURAS	vi
ĺΝΙ	DICE DE CUADROS	viii
I	RESUMEN	1
	ABSTRACT	3
II	INTRODUCCIÓN	5
Ш	REVISIÓN DE LITERATURA	8
	A FRUTO DE TOMATE	8
	1 Generalidades	8
	2 Producción e importancia económica	9
	3 Clasificación taxonómica y aspectos botánicos	9
	4 Composición química y valor nutricional	14
	5 Maduración	17
	B DAÑO POR FRÍO	18
	1 Síntomas del daño por frío	21
	2 Mecanismos relacionados con el daño por frío	23
	a Cambio de fase de las membranas	23
	b Estrés oxidativo	27
	C TRATAMIENTOS QUE BRINDAN TOLERANCIA AL DAÑO POR	30
	FRÍO	
	1 Tratamiento hidrotérmicos	31
	D CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADOS CON	35

# LA EXPOSICIÓN A LA TEMPERATURA BAJA

	1 Proteínas de respuesta al estrés	36
	2 Proteínas de unión al ARN	38
	3 Proteínas relacionadas a patogénesis	39
	4 Proteínas del metabolismo de carbohidratos y producción de energía	40
	5 Rutas de señalización, transducción y transcripción	41
	6 Enzimas	42
	E PROTEÓMICA	43
	1 Introducción	43
	2 Separación de proteínas por electroforesis bidimensional en geles de	45
	poliacrilamida (2D-PAGE)	
	3 Espectrometría de masas	47
	4 Proteómica en tomate	50
IV	JUSTIFICACIÓN	54
V	OBJETIVOS	55
	A OBJETIVO GENERAL	55
	B OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
VI	MATERIALESY MÉTODOS	56
	A MATERIALES	56
	B MÉTODOS	56
	1 Aplicación del tratamiento hidrotérmico	56
	2 Medición de parámetros de calidad	57
	a Firmeza	57

	b Color	57
	3 Índice de daño por frío (IDF)	57
	4 Lixiviación de electrolitos	58
	5 Contenido de malondialdehído (MDA)	58
	6 Preparación de la muestra para la extracción de proteínas	59
	7 Extracción de proteínas	60
	8 Separación de proteínas	60
	9 Identificación de proteínas	61
	10 Análisis estadístico	63
VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
	A PARÁMETROS DE CALIDAD	64
	1 Color en cáscara	64
	a Luminosidad (L)	66
	b Valor a (a*)	68
	c Ángulo Hue (°H)	70
	2 Firmeza	72
	B ÍNDICE DE DAÑO POR FRÍO	74
	C CAMBIOS EN PARÁMETROS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS CON	78
	ESTRÉS POR BAJA TEMPERATURA Y TOLERANCIA INDUCIDA AL	
	DAÑO POR FRÍO	
	1 Lixiviación de electrolitos	78
	2 Contenido de malondialdehído (MDA)	80
	D CAMBIOS EN LA ACUMULACIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS	82

# CON ESTRÉS POR BAJA TEMPERATURA Y TOLERANCIA INDUCIDA AL DAÑO POR FRÍO

1 Proteínas relacionadas con metabolismo de carbohidratos y		
obtención de energía		
a Rubisco	88	
b Triosa fosfato isomerasa (TpI)	91	
c Xilosa isomerasa	94	
d Enolasa	94	
e Subunidad II del complejo citocromo c reductasa/peptidasa	96	
de procesamiento mitocondrial		
2 Proteínas relacionadas con respuesta al estrés y defensa	97	
a Proteínas de choque térmico	97	
b Tioredoxin peroxidasa 1 (Tpx1)	99	
c Superóxido dismutasa (SOD)	101	
d Lactoil-glutation liasa	102	
3 Proteínas relacionadas con patogénesis	103	
a Remorina 1	103	
b Proteína relacionada con patogénesis 10	105	
4 Proteínas relacionadas con el metabolismo de proteínas y ácidos	106	
nucleicos		
a Leucin-aminopeptidasa 2 cloroplástica	106	
b Nucleósido difosfato kinasa	107	
5 Proteínas relacionadas con la regulación de la expresión de genes	108	

	a Proteína rica en glicina (GR-RBP)	108
	E CONSIDERACIONES SOBRE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS Y SU	110
	POSIBLE RELACIÓN CON EL DAÑO POR FRÍO	
VIII	CONCLUSIONES	113
IX	BIBLIOGRAFÍA	115
	ABREVIATURAS	141

# **ÍNDICE DE FIGURAS**

Fig.	Descripción	Pág
1	Corte longitudinal de un fruto de tomate	13
2	Progreso de los principales síntomas de daño por frío en tomate	24
	cv. Imperial.	
3	Representación esquemática de la espectrometría de masas en	49
	tándem	
4	Cambios en color y maduración de frutos de tomate sin TH y con	65
	TH almacenados durante 20 días a 12°C y 5°C, más un período	
	de maduración de 7 días a 21°C.	
5	Cambios en la luminosidad (L) de frutos de tomate sin TH y con	67
	TH almacenados durante 20 días a 12°C y 5°C, más un período	
	de maduración de 7 días a 21°C.	
6	Cambios en el parámetro a* de frutos de tomate Sin TH y con	69
	TH almacenados durante 20 días a 12°C y 5°C, más un período	
	de maduración de 7 días a 21°C.	
7	Cambios en el matiz °H (hue) de frutos de tomate Sin TH y con	71
	TH almacenados durante 20 días a 12°C y 5°C, más un período	
	de maduración de 7 días a 21°C.	
8	Cambios la firmeza de frutos de tomate Sin TH y con TH	73
	almacenados durante 20 días a 12°C y 5°C, más un período de	
	maduración de 7 días a 21°C.	
9	Índice de daño por frío (IDF) de frutos de tomate Sin TH y con TH	76

- almacenados durante 10 y 20 días a 5°C, seguido de un periodo de maduracón por 7 días a 21 °C.
- 10 Síntomas de daño por frío observados en frutos de tomate sin 77

  TH y con TH almacenados durante 20 días a 5°C, seguido de un periodo de maduración por 7días a 21°C.
- 11 Lixiviación de electrolitos en frutos de tomate Sin TH y con TH 79 almacenados durante 20 días a 5°C, más un período de maduración de 7 días a 21°C.
- 12 Contenido de MDA en frutos de tomate Sin TH y con TH 81 almacenados durante 20 días a 5°C, más un período de maduración de 7 días a 21°C.
- Cambios de expresión de proteínas de frutos de tomate con y sin 83

  TH almacenados a 5°C durante 0, 10 y 20 días.
- 14 Identificación por espectrometría de masas de la proteína 5 85 indicada en la figura 13.
- 15 Cambios de expresión de proteínas en frutos de tomate sin y con 89 TH almacenados por 20 días a 5°C más 7 días a 21°C.

# **ÍNDICE DE CUADROS**

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Producción mundial de tomate durante el año 2013	10
2	Principales estados productores de tomate en México durante	11
	2013	
3	Composición química del tomate fresco	15
4	Descripción de las etapas de maduración en el fruto de tomate	19
5	Identidad y función de las proteínas asociadas al daño por frío	86
	en tomate cv. Imperial sin TH y con TH almacenados durante 20	
	días a 5°C.	
6	Identidad y función de las proteínas asociadas al daño por frío	90
	en tomate cv. Imperial durante la maduración a 21°C de frutos	
	de tomate sin TH y con TH almacenados previamente por 20	
	días a 5°C.	

#### **I RESUMEN**

El tomate (Solanum lycopersicum L.) es uno de los frutos de mayor consumo en el mundo, pero su producción y distribución se ve limitada por su susceptibilidad a desarrollar daño por frío (DF) cuando se expone a temperaturas por debajo de la crítica (12°C), manifestándose con la aparición de diversos síntomas que disminuyen su calidad. Para inducir tolerancia al DF se han utilizado tratamientos hidrotérmicos (TH), los cuales han permitido reducir la presencia de los síntomas. Sin embargo, se tiene poco conocimiento sobre las bases bioquímicas de este desorden y existe poca información acerca de la expresión de proteínas en respuesta a bajas temperaturas y aquellas relacionadas con la tolerancia al DF. El objetivo del presente trabajo fue determinar cambios en parámetros fisiológicos y en la acumulación de proteínas asociadas con la tolerancia inducida al daño por frío mediante tratamiento hidrotérmico en tomate cv. Imperial. Se utilizaron frutos de tomate cv. Imperial en estado de madurez fisiológica. Los frutos se dividieron en dos lotes, de los cuales uno recibió TH (5 min, 42°C) y el otro se utilizó como control (sin TH); de cada lote la mitad de los frutos se almacenó a temperatura de daño por frío (5°C) y la otra mitad se almacenó a temperatura de no daño (12°C), ambos por 20 días. De cada sublote se retiraron frutos cada 10 días para ser almacenados a temperatura de maduración (21°C) durante 7 días. Se realizaron evaluaciones de calidad (color y firmeza), índice de daño por frío, parámetros fisiológicos [lixiviación de electrolitos y contenido de malondialdehído (MDA)], así como del patrón de expresión de proteínas entre frutos con TH y sin TH mediante electroforesis bidimensional y las proteínas acumuladas diferencialmente se

identificaron por espectrometría de masas. Las evaluaciones de calidad e índice de daño por frío indicaron que el TH favoreció un efecto benéfico contra el estrés por frío, observándose un mejor control de la maduración y una disminución de los síntomas visibles del DF. La efectividad del TH para inducir tolerancia al DF también se evidenció por una menor fuga de electrolitos y peroxidación de lípidos. El análisis comparativo del proteoma permitió separar aproximadamente 300 proteínas, de las cuales 26 se encontraron expresadas diferencialmente entre frutos con y sin TH almacenados bajo condiciones de estrés por frío. Entre los polipéptidos identificados, se observó una mayor acumulación de proteínas de choque térmico en frutos con TH, las cuales podrían estar contribuyendo en la adquisición de termotolerancia y podrían tener un papel específico en la adquisición de tolerancia al DF. La acumulación de una tioredoxina peroxidasa, superóxido dismutasa y una proteína rica en glicina que se une al ARN también fue mayor en frutos con TH y que presentaron menor incidencia de síntomas, lo que sugiere un papel importante de estas enzimas en la mayor tolerancia del tejido al frío, probablemente a través de la eliminación de radicales libres y la regulación de la expresión de genes a temperatura baja. El resto de las proteínas expresadas diferencialmente estuvieron relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y energético, patogénesis y procesamiento de proteínas. Estas proteínas podrían estar funcionando de manera conjunta para mantener la homeostasis celular bajo condiciones de estrés por frío.

#### **ABSTRACT**

Tomato is sensitive to chilling injury (CI) when exposed to temperatures below 12°C; this physiological disorder results in several symptoms that affect fruit quality. Hydrothermal treatments (HT) have been successfully used in tomato fruit to induce tolerance against this disorder. However, little is known about the biochemical basis underlying CI symptoms and the tolerance induced by HT. The aim of this study was to determine changes in physiological parameters and accumulation of proteins related to CI tolerance induced by hydrothermal treatment in tomato fruit cv Imperial. Tomato fruit were divided into two batches; one of them was subjected to hydrothermal treatment (HT) (5 min, 42°C) and the other was used as control (WHT). Tomato fruit from both treatments were stored at chilling temperature (5°C) and non-chilling (12°C) for 20 days. Fruit samples were removed from the low temperature every 10 days and transferred to a ripening room (21°C) for 7 days. Fruit quality parameters (color, firmness), chilling injury index, electrolyte leakage and malondialdehyde (MDA) were evaluated; protein expression patterns were also analyzed by using two dimensional electrophoresis and the proteins differentially expressed between both treatments were identified by mass spectrometry. Fruit quality parameters and chilling injury index indicated that HT favored normal ripening and decreased visible CI symptoms. The induced CI tolerance was further evidenced by the lower electrolyte leakage and lipid peroxidation observed in HT fruit. The proteome comparative analysis detected about 300 proteins, of which 26 proteins were differentially expressed between HT and WHT fruit stored under chilling conditions. Among the polypeptides, heat shock proteins showed higher accumulation in HT fruit, suggesting an important role for these proteins in cold tolerance; the accumulation of tioredoxin peroxidase, superoxide dismutase and glycine rich RNA-binding protein was also greater in HT fruit, suggesting an important role for these enzymes in the cold acclimatization process through the scavenging of free radicals and regulation of gene expression at low temperature. The other differentially expressed proteins were associated with carbon and energy metabolism, pathogenesis and protein processing. These proteins might be working together to maintain the celular homeostasis under cold stress.

# **II INTRODUCCIÓN**

El tomate (*Solanum lycopersicum* L) es uno de los frutos frescos de mayor consumo en el mundo y probablemente el cultivo preferido ya que no solo es consumido en fresco sino también procesado (FAOSTAT 2016). Además, el consumo de este fruto ha sido relacionado con beneficios a la salud gracias a su aporte de compuestos bioactivos, destacando el ácido ascórbico, β-caroteno y licopeno (Wold y col 2004).

El tomate es un fruto climatérico, por lo que el inicio de su maduración está acompañado de un aumento en la velocidad de respiración y en la biosíntesis de etileno (Lelievre y col 1997). Dependiendo del mercado y el área de producción, el tomate es cosechado en etapas que varían desde la madurez fisiológica hasta la madurez completa (Sargent y Moretti 2004). Para controlar la maduración los frutos normalmente son almacenados y distribuidos a temperaturas de 10 a 12°C, ya que son susceptibles al daño por frío (DF), un desorden fisiológico desarrollado en muchas plantas, así como en frutas y hortalizas, como resultado de su exposición a temperaturas inferiores a la crítica, que en tomate es de 12°C, pero sin llegar al punto de congelación (Wills y col 1989; Malacrida y col 2006).

El DF es uno de los principales factores que limitan la producción de cultivos alrededor del mundo, además de tener un gran impacto durante el almacenamiento poscosecha de frutas y hortalizas, ya que su exposición a temperaturas bajas podría inhibir la maduración normal y/o acelerar el deterioro (Paull 1990; Park y col 2004), por lo que los daños causados por este desorden

son de gran importancia económica debido a la disminución de la calidad del fruto (Gómez y col 2009).

Los mecanismos responsables del DF en plantas aún no están claros. Se ha propuesto que el mal funcionamiento de las membranas celulares a bajas temperaturas es el evento primario que conduce a este desorden (Lyons 1973, Nishida y Murata 1996), aunque en los últimos años se ha sugerido que los síntomas de DF son consecuencia de un estrés oxidativo en los tejidos (Hodges y col 2004).

Para inducir tolerancia al DF en frutos de tomate se han utilizado tratamientos hidrotérmicos (TH), los cuales han permitido reducir la aparición de los síntomas y presentan la ventaja de ser fáciles de aplicar en tiempos cortos (Fallik 2004). Cárdenas-Torres (2013) observó que la aplicación de un TH (42°C, 5 min) en frutos de tomate cv. Imperial previo al almacenamiento a 5°C disminuyó la incidencia de síntomas de DF y mantuvo las características de calidad de los frutos, disminuyendo la pérdida de peso y firmeza con respecto al control; además, la aplicación del TH resultó en un menor daño de membranas (lixiviación de solutos) y una menor peroxidación de lípidos (malondialdehído), así como un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa, lo cual se asoció con la mayor tolerancia de los frutos al DF.

Sin embargo, se tiene poco conocimiento sobre las bases bioquímicas del DF y no existe información acerca de la expresión de proteínas relacionadas con la

tolerancia inducida a este desorden. Recientemente se han realizado estudios de proteómica en tomate para evaluar los efectos causados por el DF en el perfil de proteínas en los frutos (Page y col 2010, Vega-García y col 2010). La finalidad de estos estudios fue identificar proteínas que responden al estrés por frío, pero no se han desarrollado estudios de este tipo enfocados en la identificación de proteínas asociadas a la tolerancia inducida al DF por tratamientos poscosecha como los hidrotérmicos. En este sentido, en el presente trabajo se planteó determinar cambios en parámetros fisiológicos y expresión de proteínas asociados con la tolerancia inducida al DF en tomate, contribuyendo con ello a un mejor entendimiento de este desorden fisiológico y de las bases bioquímicas de la tolerancia al estrés por frío inducida por el TH.

## III REVISIÓN DE LITERATURA

## A FRUTO DE TOMATE

#### 1 Generalidades

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los frutos de mayor consumo en el mundo y probablemente el cultivo preferido ya que no solo es consumido en fresco sino también procesado como pasta, puré, sopa, salsa, mermeladas, cátsup, entre otros (FAOSTAT 2016). Además, su popularidad se debe a sus potenciales beneficios a la salud, ya que posee buen contenido de componentes bioactivos como vitamina A, vitamina C, β-caroteno y licopeno (Wold y col 2004). Es de los frutos más estudiados por su comportamiento poscosecha, ya que el estado más deseable para su consumo en fresco es al final de la maduración y al inicio de la senescencia (Weichmann 1987).

Las especies silvestres de tomate son nativas del sur de América a lo largo de los Andes, del centro de Ecuador, a través de Perú, norte de Chile y en las Islas Galápagos. Consecuentemente, las especies silvestres crecieron en una variedad de hábitats y climas que en conjunto contribuyeron a la diversidad del tomate silvestre (Nakazato y Housworth 2011). Esta diversidad es expresada en sus características morfológicas, fisiológicas y sexuales (Peralta y Spooner 2005). En cuanto al lugar de domesticación del tomate cultivado, se han propuesto como alternativas Perú y México (Peralta y Spooner 2007). Se ha descubierto que la pre-domesticación ocurrió en la región de los Andes y su domesticación se completó en Mesoamérica,

seguido de su introducción en Europa por los Españoles para después ser propagado a todo el mundo (Blanca y col 2012).

## 2 Producción e importancia económica

El tomate es el séptimo vegetal de mayor importancia económica en el mundo después de la caña, maíz, arroz, trigo, papa y soya. De acuerdo con datos de la FAO (Food and Agriculture Organization) la producción mundial de tomate en el año 2013 fue de aproximadamente 164 millones de toneladas, siendo China el principal productor, mientras que México se ubicó en el décimo sitio, con una producción de 3,282,583 ton (Cuadro 1) (FAOSTAT 2016).

En México, el tomate es cultivado en 27 de las 32 entidades federativas (Cuadro 2), entre las cuales Sinaloa se coloca como el principal estado productor con 1,047,409 ton, de acuerdo con los valores nacionales de producción de tomate para el año 2013 (SAGARPA 2016). Con esta producción se cubre tanto el comercio interno como el externo, principalmente el de Estados Unidos, Canadá y en menor proporción Europa y Asia. Le siguen en importancia los estados de Baja California, Zacatecas y Jalisco, cuya producción se encuentra alrededor de las 200,000 ton (Cuadro 2).

## 3 Clasificación taxonómica y aspectos botánicos

El tomate pertenece a la familia de las solanáceas, la cual está constituida por más de 3,000 especies que incluyen muchas de las plantas de importancia económica en el mundo como lo son la papa, berenjena, petunias, tabaco y pimientos (Weese y Bohs 2007).

Cuadro 1. Producción mundial de tomate durante el año 2013.

	Producción	
	(Ton)	
China	50,552,200	
India	18,227,000	
EUA	12,574,550	
Turquía	11,820,000	
Egipto	8533803	
Irán	6,174,182	
Italia	4,932,463	
Brasil	4,187,646	
España	3,683,600	
México	3,282,583	
Otros	39,995,741	
Total	163,963,768	

FAOSTAT (2016)

Cuadro 2. Principales estados productores de tomate en México durante 2013.

Estado	Producción	
	(Ton)	
Sinaloa	1,047,409	
Baja California Norte	212,506	
Zacatecas	205,404	
Jalisco	199,982	
San Luis Potosí	148,204	
Michoacán	137,524	
Estado de México	124,539	
Baja California Sur	115,263	
Sonora	114,176	
Nayarit	113,338	
Otros	756,111	
Total	3,282,646	

SAGARPA (2016)

Durante muchos años se discutió su pertenencia a los géneros *Solanum* y *Lycopersicum* debido a sus relaciones filogenéticas. Recientemente, basándose en datos morfológicos y moleculares, una nueva clasificación molecular ha colocado al tomate dentro del género *Solanum* (Spooner y col 2005), por lo que se ha admitido el nombre de *Solanum lycopersicum* para el tomate cultivado (Foolad 2007). Las especies del género *Solanum* están presentes en todos los continentes con climas templados y tropicales y son reconocidas por su diversidad morfológica y ecológica (Weese y Bohs 2007).

Desde el punto de vista botánico, la planta de tomate es un fruto, no un vegetal (Bergougnoux 2013). Proviene de una planta herbácea perenne pero es cultivada generalmente como anual en las regiones templadas debido a que es sensible a las heladas (Jones 1999). Estructuralmente hablando, el fruto se puede dividir en dos partes principales que son el pericarpio y contenido locular (Figura 1). Es una baya, generada a partir de un ovario sincárpico con dos o más cavidades con placenta carnosa que contiene numerosas semillas pequeñas en forma de riñón rodeadas de parénquima de textura gelatinosa, que llenan las cavidades loculares. Una característica de los frutos es que poseen una piel o exocarpio complejo, formada por una capa de células pequeñas, con una prominente cutícula muy cutinizada (epidermis) y dos a cuatro capas de células colenquimatosas (hipodermis) que le proporcionan una gran resistencia física y, además, una baja permeabilidad ya que no hay estomas. El color de los frutos maduros puede ser rojo, rosa, naranja, amarillo y está dado por la degradación de la clorofila y el desarrollo de pigmentos carotenoides (amarillo-naranja) y licopeno, pigmento típico de este fruto de color rojo

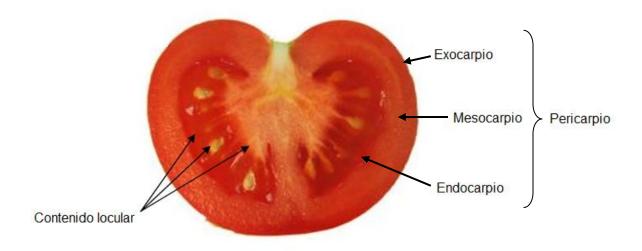


Figura 1. Corte longitudinal de un fruto de tomate.

Madhavi y Salunkhe (1998).

(Madhavi y Salunkhe 1998). Los frutos varían en forma desde redondos aplanados hasta redondos perfectos, redondos cuadrados, ovoides, en forma de pera y diferentes variaciones entre éstas (Hobson y Grierson 1993).

## 4 Composición química y valor nutricional

La composición química del tomate se ve influenciada por diferentes factores como diferencias genéticas, estado de madurez, condiciones ambientales y de cultivo, así como de las condiciones poscosecha. Los constituyentes químicos son importantes ya que determinan su calidad respecto al color, textura, apariencia, valor nutrimental y sabor (Madhavi y Salunkhe 1998; McGlasson 2003).

En el Cuadro 3 se muestra la composición química de tomate fresco, cuyo componente principal es el agua representando alrededor del 95% del peso del fruto, seguido de los hidratos de carbono donde se encuentran la fibra y azúcares libres (glucosa, fructosa y sacarosa) y de las proteínas.

El tomate es una buena fuente de ácido ascórbico y contiene también ácido fítico, ácido pantoténico, biotina, riboflavina y tiamina, y minerales como potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro y zinc. Los ácidos cítrico y málico son ácidos orgánicos que contribuyen al sabor típico del tomate. Los ácidos glutámico y aspártico, comprenden alrededor del 80% de los aminoácidos libres. El jugo locular contiene concentraciones mayores de ácidos orgánicos que las paredes loculares externas (Madhavi y Salunkhe 1998).

Los tomates verde maduros sólo contienen  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno, mientras que  $\beta$ -caroteno y licopeno contribuyen con el 7% y 87% de los carotenoides en el tomate

Cuadro 3. Composición química del tomate fresco

Componente	Contenido por 100 g de tejido fresco
Componentes mayoritarios (g)	
Agua	94.52
Proteína ( <u>N</u> x 6.25)	0.88
Lípidos	0.20
Ácidos grasos saturados	0.028
Ácidos grasos insaturados	0.114
Cenizas	0.50
Hidratos de carbono (por diferencia)	3.89
Fibra dietaria total	1.20
Azúcares totales	2.63
Glucosa	1.25
Fructosa	1.37
Aminoácidos (g)	
Ácido glutámico	0.431
Ácido aspártico	0.135
Ácidos orgánicos (g)	
Cítrico	0.43
Málico	0.08
Vitaminas (mg)	
Vitamina C (ácido ascórbico total)	13.7
Ácido nicotínico	0.594
Vitamina E (α-tocoferol)	0.540
Ácido pantoténico	0.089
Vitamina B6	0.080
Tiamina	0.037
Riboflavina	0.019
Vitamina A (UI)	833
Minerales (mg)	
Potasio	237
Fósforo	24
Magnesio	11
Calcio	10
Sodio	5
Otros (µg)	
Licopeno	2573
β-caroteno	449

USDA (2015).

rojo normal (Madhavi y Salunkhe 1998; Wold y col 2004).

El sabor del tomate está directamente relacionado con su composición química. Más de 400 compuestos volátiles han sido identificados en el fruto, pero representan solo el 0.1% de la materia seca en frutos maduros. Entre éstos, aproximadamente 30 son los principales responsables del aroma del tomate fresco. La dulzura tiene una alta correlación con el contenido de sólidos solubles, pH y azúcares reductores, mientras que la acidez tiene una alta correlación con el pH y en menor grado con la acidez titulable (Fernández-Ruíz y col 2004). Los azúcares libres representan más del 60 % de los sólidos solubles en el tomate y se encuentran principalmente Dglucosa y D-fructosa (cuadro 2), con trazas de sacarosa, cetoheptosa y rafinosa (Madhavi y Salunkhe 1998). El sabor agradable del tomate depende de la correcta relación entre estos azúcares y los ácidos presentes, principalmente cítrico y málico (Fernández-Ruíz y col 2004). La fracción lipídica de los tomates está compuesta de triglicéridos, esteroles, ésteres de esterol, ácidos grasos libres e hidrocarburos. Los ácidos linoléico, linolénico, oleico, estéarico, palmítico y mirístico comprenden la mayor proporción de los ácidos grasos (Madhavi y Salunkhe 1998).

Este fruto representa una buena fuente de vitaminas A y C (ácido ascórbico), así como de carotenoides, principalmente licopeno, debido a que es ampliamente consumido en diversas formas, una porción promedio de tomate (148 g) es suficiente para proveer aproximadamente el 40% de ácido ascórbico y el 20% de vitamina A recomendados en la ingesta diaria (IDR) de los Estados Unidos (Shi 2000; Hanson y col 2004; Simonne y col 2006). El ácido ascórbico es esencial para mantener las funciones cardiovasculares del cuerpo humano, para el desarrollo de las células y

tejido conectivo, para la utilización de hierro (Nishiyama y col 2004; Zou y col 2006) y para remover radicales libres (Hanson y col 2004). Los carotenoides son pigmentos naturales que presentan actividad provitamina A y que actúan como antioxidantes ejerciendo un efecto preventivo contra enfermedades degenerativas relacionadas con la edad, el cáncer, cataratas y enfermedades cardiovasculares. El β-caroteno presenta la mayor actividad provitamina A y se ha demostrado que ejerce un efecto preventivo con los radicales libres. El licopeno también ha sido asociado con beneficios a la salud debido a su capacidad para secuestrar moléculas de oxígeno singulete y radicales peroxilo, así como para desactivar moléculas excitadas o a los agentes que rompen la cadena de ADN (Collins y col 2006).

#### 5 Maduración

La maduración es un proceso metabólico complejo y genéticamente programado el cual genera cambios en color, textura, sabor y aroma en los frutos frescos que los hacen aptos para el consumo humano (Kevany y col 2007). El tomate presenta la característica de ser un fruto climatérico, por lo que el inicio de la maduración está acompañado de un aumento en la velocidad de respiración y en la biosíntesis de etileno (Lelievre y col 1997), hormona que juega un papel importante en el inicio de los eventos bioquímicos y en la integración de los cambios posteriores. Algunos de los cambios que se presentan acopañando la respiración y producción de etileno son la modificación de la estructura y composición de las paredes celulares afectando la firmeza del fruto, el metabolismo de ácidos y azúcares, la degradación de clorofila y la biosíntesis de licopeno (Madhavi y Salunkhe 1998).

El cambio de color es el rasgo más distintivo en la maduración del tomate. El color de los frutos depende del contenido de pigmentos carotenoides principalmente de licopeno y en menor proporción de β-caroteno (Ruíz-Sola y Rodríguez-Concepción 2012).

Dependiendo del mercado y el área de producción, el tomate es cosechado en etapas que varían desde la madurez fisiológica hasta la madurez completa (Sargent y Moretti 2004). Estas etapas son definidas de acuerdo a los estándares de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en seis clases, dependiendo del cambio de color externo del fruto. Estas etapas se describen con mayor detalle en el Cuadro 4.

El tomate es un fruto altamente perecedero y normalmente es almacenado y distribuido a temperaturas de 10 a 12°C para controlar la maduración, ya que es susceptible a un desorden conocido como daño por frío. El periodo de almacenamiento a estas temperaturas es corto lo que limita la posibilidad de comercio a países distantes que representan una oportunidad de mercado para los productores mexicanos (Crisosto y Crisosto 2002).

## B Daño por frío

El almacenamiento de frutas y hortalizas a temperaturas cercanas al punto de congelación es una de las tecnologías poscosecha más efectivas para mantener su calidad y extender la vida de anaquel. Sin embargo, existe un alto riesgo de que durante el almacenamiento a temperaturas bajas de los productos cosechados se favorezca la presencia de daño por frío, especialmente en los cultivos más

Cuadro 4. Descripción de las etapas de maduración en el fruto de tomate.

Clase	Etapa de madurez	Descripción	Apariencia Física
1	Verde	Superficie del fruto completamente verde, variando desde tenue a oscuro	7 5100
2	Rompiente	Cuando hay un cambio definido de verde a amarillo, rosa o rojo en no más del 10% del fruto	
3	Cambiante	Cuando del 10 a 30% de la superficie se muestra amarilla, rosa, roja o una combinación de éstos.	
4	Rosa	Cuando del 30 a 60% del color superficial ha cambiado de verde a rosa o rojo.	TO SERVICE OF THE PARTY OF THE
5	Rojo ligero	Cuando del 60 a 90% ha cambiado a rojo- rosado o rojo	- EN 3
6	Rojo maduro	Cuando más del 90% de la superficie es de color rojo	

Adaptado de Grierson y Kader (1986).

sensibles. Se puede describir al daño por frío (DF) como un desorden fisiológico desarrollado en muchas plantas, así como en frutas y hortalizas, como resultado de su exposición a bajas temperaturas sin llegar al punto de congelación (Malacrida y col 2006).

El daño por frío puede ocurrir antes o después de la cosecha, ya sea en el campo de cultivo cuando el fruto aún se encuentra unido a la planta, durante el almacenamiento, transporte y distribución de los productos en el mercado, e incluso durante la refrigeración en el hogar (Morris 1982; Saltveit y Morris 1990). El desarrollo de este desorden fisiológico se divide en dos eventos: el primero es dependiente de la temperatura e inicia cuando se encuentra por debajo de la temperatura crítica causando alteraciones metabólicas, mientras que el segundo evento es dependiente del tiempo de exposición e incluye una gran cantidad de procesos metabólicos disfuncionales consecuencia del evento primario, provocando los síntomas característicos que se observan en frutos con DF (Orr y Raison 1990).

El tomate es un fruto climatérico originario de regiones tropicales, por lo que es susceptible al daño por frío cuando es almacenado a temperaturas por debajo de su temperatura crítica (12°C) por más de dos semanas (McDonald y col 1999; Aghdam y col 2012). La temperatura crítica varía entre productos y se refiere a la temperatura mínima que es segura para el almacenamiento sin que se desarrollen síntomas de DF (Wills y col 1989; Malacrida y col 2006).

Los síntomas de DF se pueden desarrollar en cualquier etapa de desarrollo en la planta, donde la sensibilidad depende del tiempo y la temperatura de exposición, del

tipo de órgano de la planta y de la etapa de desarrollo (Sevillano y col 2009). La sensibilidad al DF varía durante la maduración y senescencia del fruto de tomate (Gómez y col 2009), siendo más sensible en etapas tempranas de maduración (Frenkel y Jen 1989). El DF puede presentarse durante la germinación de las semillas, almacenamiento de plántulas, crecimiento del cultivo en el campo, almacenamiento, transporte y distribución de los productos en el mercado, y durante la refrigeración en el hogar (Saltveit y Morris 1990).

El DF es uno de los principales factores que limitan la producción de cultivos alrededor del mundo, debido a que puede retrasar el crecimiento y desarrollo, reducir la productividad e incluso causar la muerte de la planta. Además tiene un gran impacto durante el almacenamiento poscosecha de frutas y hortalizas, ya que algunos de estos productos no pueden ser almacenados a temperaturas bajas debido a que se podría inhibir la maduración normal y/o acelerar el deterioro (Paull 1990; Park y col 2004), por lo que los daños causados por este desorden son de gran importancia ya que ocasionan pérdidas económicas considerables debido a la disminución de la calidad del fruto (Gómez y col 2009).

## 1 Síntomas del daño por frío

Saltveit y Morris (1990) enlistaron los síntomas de DF comúnmente reconocidos de acuerdo a su tiempo de respuesta:

 Cambios celulares. Incluyen cambios en la estructura y composición de la membrana, cese de la corriente protoplasmática, plasmólisis celular y un incremento en la velocidad de salida de componentes celulares.

- 2. Metabolismo alterado. Incremento anormal en la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> y etileno, algunas veces durante el enfriamiento y generalmente después de la remoción del tejido a temperaturas superiores. Incremento en los niveles de productos de respiración anaeróbica y otros metabolitos.
- Crecimiento reducido y muerte de la planta. El marchitamiento de las hojas y
  el desarrollo de áreas necróticas ocurren generalmente después del
  enfriamiento.
- Lesiones superficiales. Incluyen picado superficial, áreas hundidas y decoloración de la superficie; estos síntomas son agravados por el daño mecánico y las condiciones ambientales.
- Áreas sudadas. El rompimiento celular y la pérdida de integridad de la membrana resultan en el exudado de fluidos celulares hacia los espacios intracelulares.
- 6. Decoloración interna. La pulpa, hebras vasculares y semillas regularmente se tornan cafés.
- 7. Senescencia acelerada. Resulta cuando la pérdida de clorofila y la pérdida la integridad celular ocurren a una mayor velocidad.
- 8. *Incremento en la susceptibilidad al deterioro*. Los cambios precedentes proveen un medio favorable para el crecimiento de patógenos.
- 9. Falla para madurar normalmente. Los frutos que son cosechados antes de la madurez completa son incapaces de seguir la secuencia de maduración normal si son enfriados; aún si maduran, hay una pérdida del desarrollo de sabor y aroma característicos y regularmente desarrollan sabores extraños.

En el tomate, los síntomas visibles provocados por el daño por frío incluyen desarrollo de color y maduración irregulares, picado superficial, áreas sudadas, mayor incidencia de enfermedades causadas por patógenos y deterioro acelerado (figura 2). Estos síntomas generalmente aparecen cuando el tomate ha sido transferido a temperaturas superiores al DF (Morris 1982).

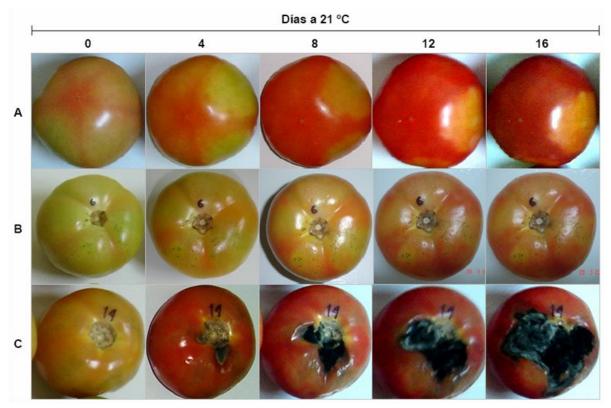
# 2 Mecanismos relacionados con el daño por frío

Los mecanismos relacionados con el daño por frío en plantas aún no están claros. Se ha propuesto que el mal funcionamiento de las membranas celulares a bajas temperaturas es el evento primario que conduce al daño por frío (Lyons 1973, Nishida y Murata 1996). Sin embargo, en los últimos años se ha sugerido que los síntomas de DF son consecuencia de un estrés oxidativo en los tejidos lo que ocasiona el daño de los frutos (Hodges y col 2004).

#### a Cambio de fase de las membranas

Las alteraciones en la conformación y estructuras de las biomembranas se consideran el primer evento a nivel molecular donde el DF tiene un efecto sobre la permeabilidad de las mismas (Lyons 1973; Sharom y col 1994). Se han encontrado diferentes formas de daño en las membranas celulares, entre las más significativas están el incremento en la lixiviación de electrolitos (González-Aguilar y col 2004; Malacrida y col 2006; Yang y col 2009), la transición de fase que ocurre en los lípidos a temperaturas críticas (Sharom y col 1994) y los cambios en la composición de lípidos (Whitaker 1994; Lurie y col 1997).

Todos estos cambios en la composición de la membrana ocasionan una



**Figura 2.** Progreso de los principales síntomas de daño por frío en tomate cv. Imperial. Los frutos fueron almacenados a 5°C por 25 días y madurados durante 16 días a 21°C. A) Maduración irregular. B) Picado superficial. C) Pudriciones.

Tomada de López-Espinoza (2008).

disminución en su fluidez, lo cual conlleva a una menor funcionalidad de la misma y de las proteínas asociadas con ella (Marangoni y col 1995).

En 1973, Lyons postuló la 'teoría de las membranas' en la cual intenta explicar estos desórdenes fisiológicos y las manifestaciones que se dan a nivel molecular cuando ocurre el DF. En ella se postula que los cambios termotróficos en los lípidos de las membranas constituyen la respuesta primaria a los desórdenes fisiológicos desatados por la exposición al frío, y son estos los responsables de las alteraciones en la organización molecular y estructural de la matriz lipídica de las membranas celulares. Esta teoría apoya la idea de que el efecto inmediato de las bajas temperaturas es un aumento en la microviscosidad de la membrana debido a una disminución de la rotación aleatoria o movimientos de plegado de las cadenas alifáticas de los ácidos grasos y una reducción en el grado de insaturación de estos ácidos. Por debajo de un valor crítico de temperatura, llamado temperatura de transición, este evento conduce a una reorganización de los lípidos de una estructura flexible de membrana líquido-cristalina, en una rígida llamada sólido-gel. Si el período de almacenamiento a temperatura baja es demasiado prolongado, entonces las regiones de la membrana afectadas por estas estructuras rígidas se extienden a la membrana entera, ocasionando pérdidas de elasticidad que conducen a trastornos funcionales de las proteínas membranales, y finalmente a la ruptura de esta misma, provocando con ello fugas de agua, iones y de metabolitos desde el interior de la célula (Lyons 1973).

Una forma de estimar el daño de las membranas es midiendo la lixiviación de electrolitos en los frutos, ya que nos puede servir como un indicador del grado de

daño que el desorden ha provocado sobre los tejidos del mismo. Zhao y col (2009) midieron la lixiviación de electrolitos durante el almacenamiento a 2°C de dos cultivares de tomate (Lichun y Santiam), encontrando que la pérdida de electrolitos aumentaba conforme se extendía el periodo de almacenamiento a baja temperatura. Malacrida y col (2006) reportaron la misma tendencia en la lixiviación de electrolitos en tomate cv. Micro-Tom almacenado a temperaturas de DF.

La peroxidación de los lípidos es también uno de los procesos responsables de la pérdida de la integridad de la membrana celular y puede ser evaluada mediante el análisis del contenido de malonil-dialdehído (MDA) (Wise y Naylor 1987). El MDA es el producto final de la peroxidación de los ácidos grasos membranales y el nivel de este compuesto es usado como un indicador del estrés oxidativo, por lo que su incremento indica un daño en la integridad de la membrana celular (Hodges y col 1999).

La consecuencia principal de ambos eventos es la pérdida de la funcionalidad de las biomembranas (Sevillano y col 2009). En un estudio realizado por Cárdenas-Torres (2013) en tomate cv. Imperial tratado hidrotérmicamente para incrementar la tolerancia al DF se evidenció la protección de la membrana celular al observar una menor lixiviación de electrolitos y un menor contenido de MDA, demostrando que estos dos parámetros son buenos indicadores fisiológicos de la pérdida de la permeabilidad y de la peroxidación de lípidos de la membrana, los cuales han sido utilizados previamente para evaluar la integridad de la membrana celular (Wise y Naylor 1987; Sharom y col 1994).

Por más de un cuarto de siglo, la hipótesis básica en el estudio del DF ha sido el cambio de fase de las membranas (Lyons 1973). Sin embargo, Saltveit (2000) indica que son varios los mecanismos involucrados en el desarrollo de los síntomas de DF.

Estudios comparativos sobre la transición de fase de los lípidos en membranas de dos especies de tomate, *Solanum lycopersicum* (especie sensible al DF) y *Lycopersicon hirsutum* (especie silvestre tolerante al DF), revelaron que la transición de fase de los lípidos totales aislados de mitocondrias, cloroplastos, hojas enteras y frutos ocurrían a temperaturas similares en las dos especies. Por lo tanto, se puede concluir que la transición de fase de los lípidos *per se*, no parece ser la causa principal de los síntomas del DF (Venema y col 2005).

#### b Estrés oxidativo

La pérdida de la integridad de las membranas celulares se ve potenciada por el proceso oxidativo, ya que el estrés ocasionado por las temperaturas bajas incrementa el nivel de las especies reactivas de oxígeno (EROs), las cuales son responsables de algunas alteraciones causadas en las plantas.

El estrés oxidativo ocurre cuando la homeostasis de la célula se ve perturbada y hay un incremento desproporcional en la producción de EROs (Scandalios 1993). Estas especies como peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo, están en exceso con respecto a la capacidad que tiene el tejido de neutralizarlos (Ghasemnezhad 2008) y son altamente reactivas por lo que pueden ocasionar daño oxidativo e inducir reacciones de peroxidación de lípidos, inactivación de enzimas, degradación de proteínas, daño al ADN, y de este modo acelerar el ciclo de

deterioración asociado con la senescencia (Zhang y col 2009; Vega-García y col 2010).

Las plantas se protegen del estrés oxidativo mediante la expresión de genes que producen moléculas que capturan las EROs. Este sistema antioxidante es complejo e incluye antioxidantes liposolubles como α-tocoferoles y carotenoides, agentes reductores solubles como glutatión y ascorbato y una serie de enzimas redox como lo son catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), ascorbato peroxidasa (APX) y superóxido dismutasa (SOD) (Malacrida y col 2006; Aghdam y col 2013). La actividad de este sistema antioxidante conduce a la reducción de las EROs, por lo tanto asegura la integridad de las membranas e induce resistencia al estrés abiótico como lo es el daño por frío (Aghdam y col 2013). Además, el balance de las actividades de SOD y APX o CAT en la célula es crucial para el mantenimiento del estado estacionario de los niveles de los radicales superóxido y peróxido de hidrógeno. El ciclo ascorbato-glutatión es también un mecanismo importante en la remoción de EROs en plantas. Su activación parece producir un efecto positivo inhibiendo el desarrollo de daño por frío (Malacrida y col 2006).

En apoyo al papel del sistema antioxidante en la tolerancia al enfriamiento, Kerdnaimongkol y Woodson (1999) demostraron que la supresión de la actividad catalasa, que es esencial para la detoxificación de EROs, condujo a una mayor susceptibilidad al DF en plantas transgénicas de tomate Ohio 8245 respecto a las plantas control. Por otro lado, Wang y col (2005) observaron que el incremento en la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa, consecuencia de la sobreexpresión de un gen APX citosólico, aumentó la resistencia al daño por estrés oxidativo en plantas

transgénicas de tomate expuestas a temperaturas bajas. En otro reporte, se evaluó la respuesta antioxidante de tomate cv. Micro-Tom almacenado a una temperatura de 4°C y se encontró que dicha respuesta estaba mediada por la actividad de las enzimas CAT y GR, más no se observó relación con la actividad de las enzimas SOD o APX, aunque los resultados no permitieron observar un patrón de comportamiento definido (Malacrida y col 2006). Posteriormente Gómez y col (2009) indicaron que APX y SOD se incrementaban en tomate cv. Micro-Tom como respuesta inmediata al estrés provocado por el DF. Zhang y col (2010) observaron que al almacenar tomate Messina en condiciones de DF, la actividad de SOD se incrementaba con el transcurso de los días de almacenamiento, mientras que CAT disminuía con valores fluctuantes y para APX mostraba un incremento dentro de los primeros 14 días de almacenamiento y después disminuía rápidamente. Recientemente, Cárdenas-Torres (2013) utilizó un tratamiento hidrotérmico en tomate cv. Imperial para conferirle tolerancia al DF; los frutos tratados térmicamente mostraron una mayor integridad de la membrana celular y mayor actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y APX, lo cual se relacionó con una mayor tolerancia al DF.

Las membranas contienen ácidos grasos insaturados que son particularmente vulnerables a la oxidación, por lo que la formación de EROs puede estar asociada ocasionalmente con alteraciones en la función de las mismas. Por lo tanto, los modelos de la membrana y el estrés oxidativo pueden estar relacionados. Además, la fluidez de las membranas señalada por la teoría de Lyons (1973) no solo es regulada por la composición de ácidos grasos, sino también por la interacción lípidos-proteínas (Kluge y Schomburg 1996), por lo que los cambios en proteínas inducidos por las

temperaturas bajas podrían revelar la síntesis de proteínas de aclimatación necesarias para restablecer o continuar los procesos normales del fruto que han sido interrumpidos por el almacenamiento a temperatura de daño.

# C TRATAMIENTOS QUE BRINDAN TOLERANCIA AL DAÑO POR FRÍO

Con el amplio uso de las cadenas de frío durante el transporte y almacenamiento de frutas y hortalizas, es necesario el desarrollo de tecnologías poscosecha que disminuyan la aparición del daño por frío sobre todo en las especies de plantas sensibles a las temperaturas bajas (Ma y col 2014).

Varios tratamientos como atmósferas controladas, pretratamientos con cloruro de calcio, acondicionamiento a temperaturas bajas y enfriamiento gradual, han sido utilizados para reducir el daño por frío en diferentes frutos; sin embargo, se ha reportado que tratamientos térmicos como inmersión en agua caliente y secado con aire caliente son efectivos para disminuir síntomas e inducir tolerancia al daño por frío en tomate (Zhang y col 2013).

La aplicación de un tratamiento térmico podría utilizarse como una tecnología poscosecha que favorezca la disminución del daño por frío y el mantenimiento de la calidad de los frutos, sin embargo si es aplicado en forma inapropiada puede tener efectos adversos en la calidad de los frutos (Petit-Jiménez y col 2009). Recientemente se han demostrado los efectos beneficiosos de la aplicación de los tratamientos hidrotérmicos en la inducción de la tolerancia al daño por frío en tomate ya que han sido empleados exitosamente para disminuir los síntomas (Lurie y col 1997), prevenir el desarrollo de pudriciones (Fallik 2004) y retrasar el proceso de

maduración (Vega-Espinoza 2010); además se ha observado un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes (Cárdenas-Torres 2013) y en la expresión de genes relacionados con estrés térmico, detoxificación y metabolismo de carbohidratos (Cruz-Mendívil y col 2015).

#### 1 Tratamiento hidrotérmico

El agua es un medio de transferencia de calor más eficiente que el aire (Lurie 1998), por lo que los tratamientos hidrotérmicos (TH) se aplican sumergiendo los frutos en agua caliente con temperaturas desde 43 a 53°C durante tiempos de 1 a 15 minutos, esto, previo al almacenamiento a temperaturas bajas. La aplicación del TH presenta diversas ventajas entre las que se encuentran su facilidad de aplicación, períodos de aplicación cortos por lo que no modifican los parámetros de calidad del fruto en comparación con tratamientos extensos con aire caliente, además de un fácil monitoreo de las temperaturas y menor riesgo de que el producto sufra quemaduras superficiales como consecuencia del calor aplicado (Fallik 2004; Sevillano y col 2009). La mayor tolerancia al daño por frío que presentan los alimentos tratados hidrotérmicamente se puede explicar mediante la activación de seis diferentes mecanismos:

1. Mejora de la integridad de la membrana por el incremento en la relación ácidos grasos insaturados (AGinSat) / saturados (AGSat) debido a una mayor actividad de las ácido grasos desaturasas (AGDS) y una disminución en la actividad de enzimas responsables de la degradación de los ácidos grasos

- insaturados como la fosfolipasa D (PLD) y lipoxigenasa (LOX) (Los y Murata 1998; Hernández y col 2001; Yu y col 2009; Rui y col 2010).
- 2. Mayor expresión de genes que codifican proteínas de choque térmico (HSPs), las cuales funcionan como chaperonas moleculares manteniendo la estabilidad de las proteínas (Thomashow 1999), mediante el reconocimiento y unión a proteínas incompletamente plegadas con el fin de completar su plegado correcto, la prevención en la agregación de proteínas y facilitar la renaturalización de proteínas agregadas (Ellis y van der Vies 1991; Craig y col 1994; Lee y Pokala 1995; Boston y col 1996).
- 3. Mejora de la actividad del sistema antioxidante (SOD, APX, GR, y CAT) lo que conduce a una menor acumulación de ROS y una mejor relación de AGinSat/AGSat consecuencia de una menor peroxidación de lípidos (Hodges y col 2004; Shao y Tu 2013).
- 4. Activación de vías de conversión de arginina a moléculas con carácter antioxidante como poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) y de señalización como óxido nitroso (NO) y prolina, este último involucrado en la regulación osmótica entre el citoplasma y la vacuola, regulación redox de NAD+/NADH, en la estabilización de la membrana y activación de sistemas de eliminación de ROS (Sharp y col 1990; Bohnert y Jensen 1996; Soleimani 2014).
- Alteración en la actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa cuyo incremento en general está relacionado con la respuesta del órgano de la planta para contrarrestar el daño por frío (Ismail y Brown 1979; Rinaldo y col

- 2010). Sin embargo, la correlación de esta enzima con la resistencia o sensibilidad depende en gran medida de la planta y cultivar.
- 6. Aumento en el metabolismo de glúcidos (inversión de la sacarosa) para satisfacer las necesidades energéticas de la biosíntesis de las proteínas de choque térmico y compuestos antioxidantes como ácido ascórbico y glutatión que ayudan al mantenimiento de la función de proteínas y la integridad de la membrana, respectivamente (Couée y col 2006; Liu y col 2013).

El TH ha sido empleado exitosamente en tomate para disminuir los síntomas ocasionados por el DF (Lurie y col 1997), retrasar el proceso de maduración (Akbudak y col 2007; Vega-Espinoza 2010) y prevenir el desarrollo de pudriciones (Fallik 2004). Sin embargo, tratamientos hidrotérmicos prolongados o a temperaturas altas pueden afectar o deteriorar la calidad del fruto, por lo que la temperatura a utilizar depende de la especie, tamaño, madurez o estado de maduración y las condiciones de cultivo.

Diversos estudios han reportado el efecto de la aplicación del tratamiento hidrotérmico sobre los síntomas ocasionados por el DF, entre estos estudios se encuentra el realizado por Lurie y col (1997), quienes evaluaron la magnitud del DF en tomates cv. Daniella, comparando la aplicación de tratamientos térmicos con aire caliente (3°C, 48 h) o inmersiones en agua caliente (40°C, 30 min; 2 min a 46, 48 ó 50°C) en contraste con tomates sin tratamiento térmico. Estos autores encontraron que los tomates sin TH presentaban mayor daño, infecciones fúngicas y un mayor deterioro que los tomates sometidos al tratamiento con aire caliente o con inmersión en agua caliente. Por otra parte, Yang y col (2009) evaluaron el efecto de la

aplicación de TH (40 o 45°C por 5 o 15 min) sobre el DF en tomate cherry verdemaduro y observaron que el tratamiento inducía una mayor tolerancia al DF, y a su vez reportaron que los mayores daños se presentaban en las células y organelos del tejido del pericarpio de los frutos sin TH. En otro estudio realizado por Luengwilai y col (2012) en frutos de tomate cv. Micro-Tom verde-maduro, encontraron que al aplicar un TH con diferentes tiempos y temperaturas de inmersión (3-9 min a 30-50°C) se presentaba una disminución en el desarrollo de síntomas de DF en frutos tratados, así como una menor aparición de daños en las membranas, lo cual fue evidenciado por una reducción en la lixiviación de electrolitos. Cárdenas-Torres (2013) evaluó el efecto de un TH (42°C, 5 min) sobre la tolerancia al DF en frutos de tomate cv. Imperial almacenados a 5°C y 12°C, encontrando que el TH disminuyó el desarrollo de síntomas y logró una mejor retención de la calidad de los frutos, esto es, la pérdida de peso y la firmeza no sufrieron modificaciones importantes, mientras que el color sólo se modificó en frutos almacenados a 5°C; además, la aplicación del TH causó un menor daño en las membranas y una menor peroxidación de lípidos, así como un incremento en la actividad de las enzimas SOD, CAT y APX, confiriéndole a los frutos una mayor tolerancia al daño por frío.

Recientemente, Cruz-Mendívil y col (2015) evaluaron el efecto del TH sobre la expresión génica en frutos de tomate Micro-Tom almacenados a temperaturas de daño por frío (5°C) durante 14 días y posteriormente madurados a 20°C por 14 días. En este estudio, el TH mostró un efecto protector contra el DF en los frutos de tomate evidenciado por una reducción en los síntomas visuales (maduración irregular y marchitez), lo cual a su vez se asoció con una disminución en la pérdida de peso,

fuga de electrolitos, velocidad de respiración y firmeza, además de que el TH favoreció la inducción de genes relacionados con estrés térmico, detoxificación y metabolismo de azúcares.

Sin embargo, la información actual sobre la regulación molecular de los TH para disminuir e inducir tolerancia al DF es aún limitada.

# D CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADOS CON LA EXPOSICIÓN A TEMPERATURAS BAJAS

Las plantas han desarrollado la habilidad de responder en defensa propia al estrés ambiental (biótico o abiótico) gracias a sus características genómicas, proteómicas y metabolómicas. Esta autodefensa se lleva a cabo mediante la alteración del patrón de la expresión de genes, que da como resultado un cambio en la expresión de las proteínas, lo que conduce a la modificación de ciertas rutas metabólicas y de defensa (Timperio y col 2008).

La exposición de las plantas a temperaturas de DF resulta en cambios genéticamente programados en la bioquímica y fisiología del vegetal que son críticos para su supervivencia a temperatura baja. De este modo, diversas familias de proteínas se han asociado con las respuestas al estrés por frío de los tejidos vegetales, ya sea por su aparición, acumulación o disminución (Renaut y col 2006). Estas proteínas están involucradas en muchos procesos incluyendo la transducción de señales, procesamiento del RNA, en la traducción, procesamiento de proteínas, homeóstasis REDOX, fotosíntesis, en el metabolismo del carbono, nitrógeno, azufre y en la obtención de energía (López-Espinoza 2008). Algunas de las proteínas

identificadas en estos estudios incluyen peroxidasas, proteínas de choque térmico (HSPs) y proteínas de unión al ARN, rubisco y enzimas del metabolismo para obtención de energía (Renaut y col 2006; Yan y col 2006).

## 1 Proteínas de respuesta al estrés

Existen diversas proteínas involucradas en la respuesta de tejidos vegetales a diferentes tipos de estrés, cuya función principal es luchar contra las alteraciones y los defectos en la síntesis de otras proteínas celulares, con el objeto de proteger a las células de los daños que puedan sufrir (Powers y col 2001).

Las temperaturas bajas incrementan el riesgo del desplegamiento de las proteínas, resultando en el mal funcionamiento de las mismas. Se ha reportado el incremento en la acumulación de las proteínas con función de chaperonas, entre las cuales se encuentran diversas chaperonas, especialmente diferentes tipos de proteínas de choque térmico (HSPs), así como chaperoninas citosólicas, cloroplásticas y mitocondriales (Cheng y col 2010).

Las proteínas de choque térmico (HSPs, Heat Shock Proteins), las cuales se definen como aquellas que pueden ser inducidas por las temperaturas altas en diversos organismos; pueden ser necesarias para la supervivencia y reproducción de las células bajo condiciones de estrés, y probablemente también bajo condiciones de no estrés. La mayoría de las HSPs eucarióticas han sido agrupadas de acuerdo a su masa molecular aproximada en kilodaltones (kDa) en cinco clases conservadas, nombradas HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y HSPs de bajo peso molecular (sHSPs) (16-42 kDa) (Pimentel 1994). De éstas, las sHSPs constituyen el grupo de

proteínas sintetizadas en vegetales en respuesta al estrés térmico más abundante y diverso (Waters y col 1996) y se ha observado que tanto en vegetales como en mamíferos poseen actividad molecular de chaperonas *in vitro* (Jacob y col 1993), previniendo la agregación de proteínas durante el estrés térmico (Haslbeck 2002).

Es bien conocido, que bajo condiciones de crecimiento normales, la mayoría de las HSPs usualmente no son detectables, sin embargo se acumulan rápidamente en respuesta a un estrés térmico u otro tipo de estrés (Sabehat y col 1998, Ding y col 2001; Wang y col 2004; Nautiyal y Shono 2010). Además, la acumulación de las HSPs, a menudo confiere protección no solo contra el estrés que provoca su biosíntesis sino también contra cualquier situación de estrés a la cual la planta u órgano es expuesto (Sevillano y col 2009).

Kósova y col (2011) en un estudio realizado en trigo previamente aclimatado al frío, indicaron que las temperaturas bajas, conllevaron a una mayor acumulación de algunas HSP con funciones de chaperona, especialmente una HSP70, mientras que por otro lado provocó una menor acumulación de otras HSP, como la HSP90. Bajo condiciones normales, la HSP90 contribuye resguardando alelos alternativos de genes de varias proteínas de una población dada que ayuden en la regulación del plegamiento correcto de las proteínas, sin embargo, bajo condiciones de estrés, la acumulación de esta proteína disminuye, por lo que los alelos alternativos de estas proteínas podrían dar lugar a una conformación alternativa, lo cual podría contribuir en la variabilidad fenotípica de las plantas en respuesta al estrés por frío.

En los últimos años, estudios sobre el proteoma del tomate han identificado enzimas implicadas en el control del estrés oxidativo, entre ellas la ascorbato peroxidasa (APX), dehidroascorbato reductasa (DHAR), superóxido dismutasa (SOD), metionina sulfóxido reductasa también conocido como proteína E y tioredoxin peroxidasa 1(TPxI) (Rocco y col 2006; Vega García y col 2010), las cuales confieren protección al tejido contra el frío (Hodges y col 2004; Malacrida y col 2006).

#### 2 Proteínas de unión al ARN

La exposición al frío, afecta significativamente en la síntesis de proteínas. Diversos estudios han reportado el incremento de proteínas que se unen al ARN (RNA-Binding proteins) las cuales están involucradas en el procesamiento del ARNm (Amme y col 2006; Gau y col 2009; Reiland y col 2009) y tienen además un papel crucial durante el crecimiento, desarrollo y defensa al estrés de las plantas (Kim y col 2010a).

Las proteínas que se unen al ARN (RBPs, RNA-Binding Proteins) participan de manera directa e indirecta en la regulación de la expresión de genes a nivel post-transcripcional. Esta regulación incluye el procesamiento del pre-ARNm (pre-ARN mensajero), adición de 5-metilguanosina, poliadenilación, transporte, estabilidad y traducción del ARNm (Kim y col 2007b).

En los últimos años, ha habido un avance considerable en la identificación de RBPs que contienen uno o más motivos de reconocimiento al ARN (RRM) en el extremo N-terminal y una variedad de motivos auxiliares en el extremo C-terminal (Kim y col 2005). Estos motivos auxiliares incluyen el dominio rico en glicina, el

dominio rico en arginina, la caja RGG y el motivo dedo de zinc, entre otros y pueden estar involucrados en la interacción con otros factores de proteínas (Kim y col 2007b).

Entre la diversidad de las RBPs identificadas en plantas, las proteínas de unión al ARN ricas en glicina (GR-RBPs, Glycine-rich RNA-binding proteins) poseen un motivo de reconocimiento al ARN (RRM) en el amino N-terminal y en la región rica en glicina C-terminal. Estas GR-RBPs se encuentran presentes en todas las plantas y su implicación en la respuesta al estrés de las plantas ha sido indicada por diversos análisis de expresión (Molina y col 1997; Horvath y Olson 1998; Sachetto-Martins y col 2000). En particular, se ha reportado que la función de las GRBPs durante la adaptación al frío ha sido relacionada con una mayor acumulación inducida por las temperaturas bajas (Kim y col 2010).

Diversos estudios en *Arabidopsis* (Kim y col 2005; Kwak y col 2005; Kim y col 2007a; Kim y col 2007b) y en arroz (*Oryza Sativa*) han determinado la funcionalidad y efecto de las GRBPs en la tolerancia al estrés y la adaptación al frío (Kim y col 2010). Los resultados reportados en esta serie de estudios reflejan claramente que las GRBPs tienen un papel muy importante en la respuesta de las plantas bajo diferentes tipos de estrés.

## 3 Proteínas relacionadas a patogénesis

Las proteínas relacionadas a patogénesis (RP) son expresadas en plantas en respuesta a infecciones patogénicas, estrés ambiental, componentes químicos y heridas (van Loon 1997). Se han identificado catorce grupos de estas proteínas,

algunas de las cuales responden a las temperaturas bajas: RP-2 (β-1,3-glucanasas), RP-3, 4, 8 y 11 (quitinasas), RP-5 (proteínas como taumatina) y RP-10 (homólogos Bet v-1) y RP-14 (proteínas de transferencia de lípidos) (Griffith y Yaish 2004). Aunque su papel no ha sido entendido del todo, se ha sugerido que podrían ser un componente de la ruta de transducción de señales disparada como respuesta general al estrés (Hoffmann-Sommergruber 2000).

## 4 Proteínas del metabolismo de carbohidratos y producción de energía

El frío como un factor de estrés, ha sido asociado con alteraciones significativas en el metabolismo energético. Estas alteraciones incluyen el decremento en la velocidad de catálisis de las enzimas resultando en un desbalanceo metabólico el cual ha sido asociado con el estrés oxidativo (Kosová y col 2011). Muchos estudios, han indicado cambios en la abundancia de algunas enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos en respuesta al frío. En general, se ha observado un incremento en la expresión de las enzimas en las rutas catabólicas y una disminución de la expresión en las rutas anabólicas (Andriotis y col 2010).

Existe una gran gama de proteínas implicadas en el metabolismo de compuestos de carbono y en la producción de energía en tomate. La expresión de estas proteínas varía de acuerdo a factores bióticos, abióticos y la diversidad genética del fruto, lo que se refleja en las características de calidad del fruto tales como la firmeza, sabor, contenido de sólidos solubles, entre otros. Tal es el caso del malato deshidrogenasa citosólica dependiente de NAD (CMDH) y la malato deshidrogenasa mitocondrial (MMDH), las cuales están implicadas en la regulación de la concentración de ácido

málico y la oxidación de malato en respuesta al estrés térmico durante la maduración, respectivamente (Miller y col 1998).

En relación al anabolismo y catabolismo, se han identificado enzimas como la pirofosfatasa citosólica implicada en la acumulación de almidón, la fructoquinasa cuya función sugerida es la importación de azúcar y no la biosíntesis del almidón como antes se creía (Dai y col 2002; Rocco y col 2006), β-fructofuranosidasa (invertasa ácida), la uridiltransferasa UTP-glucosa-1-fosfato, triosafosfato isomerasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, aldolasa, fosfoglicerato quinasa y enolasa, involucradas en la glucólisis y gluconeogénesis y cuya concentración va en decremento durante la maduración (Rocco y col 2006; Faurobert y col 2007).

## 5 Rutas de señalización, transducción y transcripción

El estado de oxidación-reducción (redox) de la célula puede participar en la regulación de la expresión de genes en respuesta a la temperatura baja involucrando al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kocsy y col 2001). Conforme la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementa en las plantas expuestas al frío, se induce un cambio en el estado redox, conduciendo a una mayor actividad de enzimas como glutatión reductasa y catalasa, entre otras (Renaut y col 2006). Kocsy y col (2001) propusieron que el enfriamiento induce cambios en el estado redox como una de las rutas de señalización activadas por la temperatura baja, dando como resultado cambios en la expresión de genes. Otras rutas de señalización son mediadas por ácido abscísico, Ca<sup>+2</sup> o ácido salicílico (Renaut y col 2006). El calcio funciona como un mensajero importante en la percepción del estrés en plantas; su concentración citosólica incrementa durante la exposición al frío y transduce una señal vía cinasas y cascada de fosforilación (en

particular MAPK y proteína cinasa dependiente de Ca<sup>+2</sup>-CDPK). Además, otras proteínas se unen al Ca<sup>+2</sup> durante la transducción de señales, como anexinas (formando canales a través de la membrana plasmática), calmodulinas y calcineurinas (White y Broadley 2003) por lo que la entrada de Ca<sup>+2</sup> en respuesta al frío requiere el arreglo de microfilamentos de actina después de la solidificación de las membranas (Orvar y col 2000).

Entre los factores de transcripción, la familia de factores de enlace C-repetidos (CBF, C-repeat binding factors) activa los genes que responden al frío, así como los genes involucrados en las respuestas por deshidratación (Thomashow y col 2001). Renaut y col (2005) reportaron una mayor abundancia de CBF1, anexina y MAPK cinasas en plántulas de álamo enfriadas respecto a las control. Gong y col (2002) identificaron un regulador de genes *CBF* y demostraron la importancia de la regulación del gen y los activadores transcripcionales CBF en la resistencia al enfriamiento en plantas.

#### 6 Enzimas

Los cambios en la expresión y actividad de enzimas involucradas en diversas rutas metabólicas han sido reportados como respuesta a la temperatura baja (Hurry y col 1995); entre éstas se encuentran enzimas involucradas en el metabolismo de hidratos de carbono, prolina y lignina, en fotosíntesis y detoxificación (Renaut y col 2006).

Bae y col (2003) realizaron un análisis del proteoma nuclear de *Arabidopsis*, identificando 54 proteínas que respondieron al estrés por frío, las cuales estuvieron involucradas en diferentes funciones celulares. Entre las proteínas detectadas se

encontraron algunas asociadas previamente al estrés, incluyendo HSPs, factores de transcripción, proteínas que se unen al ADN, enzimas catalíticas, sintaxina y calmodulina. Sin embargo, dado que las proteínas se encuentran en diferentes componentes y organelos celulares, el análisis del total de proteínas puede proporcionar un mejor entendimiento de las respuestas al estrés por frío. En este sentido, Yan y col (2006) realizaron un análisis comparativo del patrón de proteínas en hojas de plantas de arroz sometidas a condiciones de daño por frío contra hojas de plantas control. Entre sus resultados encontraron 93 proteínas expresadas diferencialmente, 85 de las cuales fueron identificadas exitosamente. Las proteínas identificadas estuvieron involucradas en diversos procesos, como transducción de señales, procesamiento del ARN, traducción, procesamiento de proteínas, homeostasis redox, fotosíntesis, fotorespiración y metabolismo del carbono, nitrógeno, azufre y energía. Además, encontraron que algunas proteínas fueron parcialmente degradadas por el enfriamiento.

A pesar de esto, se tiene poco conocimiento sobre las bases bioquímicas del daño por frío y existe muy poca información acerca de la expresión de proteínas en respuesta a las bajas temperaturas, así como en la tolerancia inducida al DF. Debido a la utilidad que ha tenido la proteómica para avanzar en el entendimiento de las respuestas al DF, a continuación se describe brevemente esta herramienta y los principales estudios que se han realizado principalmente en tomate.

## E PROTEÓMICA

#### 1 Introducción

El avance en la secuenciación de los genomas completos y el rápido incremento en la disponibilidad de segmentos de secuencias expresadas (EST, Expressed Sequence Tag) han ampliado las perspectivas para el análisis de los sistemas biológicos y sus funciones complejas a diferentes niveles (Rose y Saladié 2008). En paralelo a la acumulación de una gran cantidad de datos sobre los ácidos nucleicos, el desarrollo tecnológico ha permitido establecer sistemas para el análisis a nivel de transcritos y proteínas (Cánovas y col 2004). Sin embargo, aun cuando la transcriptómica resulta una herramienta atractiva debido a que el ARN es químicamente homogéneo y relativamente fácil de extraer, manipular *in vitro*, amplificar y secuenciar (Alba y col 2004), diversos estudios han demostrado que los cambios en la expresión de genes a nivel de transcritos no siempre corresponden con los cambios a nivel de proteínas (Kosová y col 2011).

El análisis del proteoma provee una representación más adecuada del estado celular por diversas razones: la regulación de los eventos celulares puede ocurrir a nivel de proteínas sin aparente cambio en la abundancia de ARNm, las modificaciones post-traduccionales de las proteínas resultan en una mayor complejidad que no corresponde a variaciones en la expresión de genes y el proteoma refleja la expresión de las moléculas que influencian más directamente la bioquímica celular (Rose y col 2004).

La proteómica es la determinación de la secuencia, cuantificación, estado de modificación, patrones de interacción, actividad, localización subcelular y estructura de proteínas de un tipo de célula en un determinado momento (Liebler 2002). La proteómica, se ha convertido en una herramienta clave, porque nos provee de

información cuantitativa y estructural de las proteínas, lo cual es información altamente determinante para la función celular (Cox y Mann 2007). A la fecha, la mayoría de los estudios de proteómica vegetal pueden ser divididos en dos categorías básicas; la primera involucra el perfil de proteínas del material biológico con el fin de separar, secuenciar y clasificar la mayor cantidad de proteínas posible, donde el objetivo es identificar la colección completa de proteínas de un sistema biológico; la segunda categoría fundamental del análisis del proteoma puede ser determinada como proteómica comparativa, cuyo objetivo es caracterizar diferencias entre diferentes poblaciones de proteínas. Para evaluar y contrastar poblaciones de proteínas complejas, los elementos clave incluyen la extracción y detección de la mayor cantidad posible de proteínas minimizando las técnicas post-extracción, cuantificación precisa y comparación de las muestras, identificación de proteínas y finalmente, integración de la información de la expresión de proteínas con otra serie de datos (Rose y col 2004).

Recientemente, ha habido una tendencia creciente en el uso de los métodos de proteómica para estudiar e identificar los cambios globales en la estructura y abundancia de las proteínas en el campo de la fisiología de plantas (Palma y col 2011).

# 2 Separación de proteínas por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE)

Aunque la proteómica es una ciencia relativamente nueva, se ha establecido sobre la base de técnicas analíticas conocidas (Humphery-Smith y col 1997) como lo

es la electroforesis bidimensional (2D-PAGE), que es un sistema que se adecua perfectamente para la separación de mezclas complejas de proteínas. Esta técnica se estableció por primera vez para la separación de las proteínas de cereales (Wrigley 1968,1970) y con su evolución ha adquirido un enorme potencial para la separación de proteínas. La electroforesis bidimensional separa las proteínas por medio de dos parámetros fisicoquímicos. La primera dimensión, conocida también como isoelectroenfoque, separa las proteínas a través de un gradiente de pH inmovilizado; las proteínas migran hasta el punto en el cual su carga es cero, es decir, hasta que llegan a su punto isoeléctrico (pl). La segunda dimensión separa las proteínas en función de su masa molecular utilizando un agente tenso-activo, como dodecil sulfato de sodio (SDS), que se une a la proteína para proporcionar una relación uniforme entre la carga y la masa, lo que permite que las proteínas se separen de acuerdo a su masa (Hebert y col 1997; Görg y col 2004).

La aplicación principal de la 2D-PAGE es la proteómica de expresión. En este sentido, la acumulación de proteínas de dos muestras se puede comparar de forma cualitativa y cuantitativa. La aparición o desaparición de manchas proporciona información sobre la acumulación diferencial de proteínas y la intensidad de las manchas permite conocer los niveles de acumulación (Gil-García 2003). Posteriormente las manchas son identificadas mediante espectrometría de masas.

Para el análisis comparativo del proteoma, aún no existen técnicas que superen a la electroforesis bidimensional (2D-PAGE) (Rose y col 2004). Algunas de las etapas críticas en 2D-PAGE, son la preparación de la muestra y la solubilización de las proteínas, así como obtener un buen enfoque de las mismas. Posteriormente, las

proteínas se visualizan por tinción con azul de Coomassie o plata; sin embargo este último método de tinción no es compatible con la identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS) (Patton 2000), ya que fija las proteínas en el gel, previniendo su digestión y la recuperación de algunos péptidos formados (Liebler 2002).

Para la identificación de las proteínas de interés, una vez identificadas las diferencias mediante programas computacionales (PD-Quest) la proteína es removida del gel y digerida con una proteasa, usualmente tripsina, generando péptidos. La mezcla de péptidos se lava para eliminar las sales y se resuspende en un solvente adecuado para su análisis posterior por espectrometría de masas (Görg y col 2004).

# 3 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas ha llegado a ser la principal tecnología para la identificación de proteínas debido a su eficiencia, precisión y sensibilidad. Es una técnica que mide con alta sensibilidad la relación masa/carga (m/z) de iones en fase gaseosa. El éxito obtenido en el área de las ciencias biológicas, se debe a la introducción de técnicas suaves de ionización que les permiten a las biomoléculas pasar a una fase gaseosa en forma de iones intactos (Lane 2005). Estos iones pasan a través de un espectrómetro de masas, el cual consiste básicamente de una fuente de iones, para generar iones a partir de la muestra; un analizador de masas, para separar los iones de acuerdo a su relación masa/carga (m/z); un detector para

registrar el número de iones emergentes del analizador y una computadora para procesar los datos y generar el espectro de masas (Yates 2000; Lane 2005).

Existen principalmente dos plataformas de MS para los estudios de proteómica: la espectrometría de masas en una sola etapa (MS) y en tándem (MS/MS). En el primer paso se registra solo el espectro de masas de los péptidos, la huella digital de la proteína (Köcher y Superti-Furga 2007); ésta es comparada con la lista de masas de péptidos predicha de cada proteína en la base de datos y su digestión teórica (Rose y col 2004). MS/MS proporciona información sobre la secuencia de péptidos y puede ser utilizada cuando se analizan mezclas de proteínas o muestras con proteínas modificadas.

En la Figura 3 se muestra el esquema de un análisis por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). La primera etapa de MS/MS involucra la ionización de la muestra digerida y la separación basada en la relación m/z de los iones primarios. Posteriormente, un ión con un valor específico de m/z es seleccionado y fragmentado; la colisión del ión con un gas inerte (disociación inducida por colisión, CID, collision-induced dissociation) es el método más utilizado para inducir la fragmentación.

Por último, los valores m/z de los iones fragmentados son determinados después de pasar a través de un segundo analizador de masas (Good y Coon 2006). Este proceso produce una serie de iones fragmentados que pueden diferir por un solo aminoácido, rindiendo una porción de la secuencia del péptido determinada por

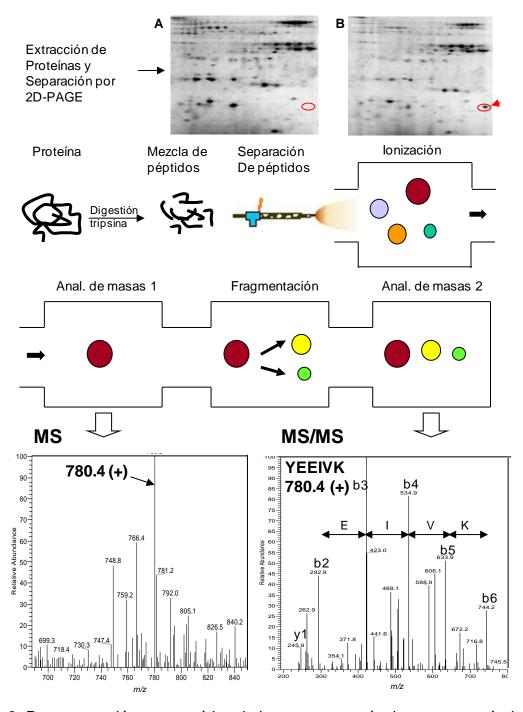


Figura 3. Representación esquemática de la espectrometría de masas en tándem.

diferencia de masas y usada para la búsqueda en la base de datos. Cuando un péptido ha sido identificado en la base de datos, el patrón de fragmentación teórica puede ser predicho y comparado con el espectro MS/MS observado para la asignación de otros picos que puedan validar la identificación. Este procedimiento puede ser repetido para cada péptido fragmentado, conduciendo a la verificación adicional o a la identificación de otras proteínas en la muestra (Rose y col 2004).

#### 4 Proteómica en tomate

El tomate representa un modelo adecuado para su uso en estudios de proteómica, ya que recientemente se ha generado una gran cantidad de información genética y recursos genómicos que son herramientas bioinformáticas invaluables para la identificación de proteínas (Bombarely y col 2011).

A pesar de lo anterior, se han publicado pocos estudios sobre el proteoma del tomate, especialmente del fruto (Palma y col 2011). Dentro de los estudios realizados se pueden mencionar algunos enfocados en la identificación de proteínas relacionadas con el desarrollo de las semillas (Sheoran y col 2005), desarrollo y maduración del fruto (Rocco y col 2006; Faurobert y col 2007; Xu y col 2013), respuestas a estrés por inundación en hojas (Ahsan y col 2007), salinidad en hojas (Manna y col 2013) y raíces (Muneer y col 2015), calor (Iwahashi y Hosoda 2000) y frío en frutos (Page y col 2010; Vega-García y col 2010; Sánchez Bel y col 2012).

En el caso del fruto de tomate, el contenido y composición de las proteínas que lo constituyen varía continuamente durante su desarrollo (Gillaspy y col 1993). Si bien la cantidad de proteínas del fruto es menor a 1 g por 100 g de tejido fresco (Cuadro

3), estas desempeñan un papel primordial en el desarrollo del mismo, proporcionándole en ocasiones la posibilidad de sobrevivir y recuperarse de condiciones desfavorables (Sabehat y col 1996).

Rocco y col (2006) realizaron un análisis comparativo del proteoma de frutos de tomate ecotipo regional (S. Camaza) y comercial (Ailsa Craig) durante la maduración. Este análisis permitió una comparación del repertorio de proteínas, así como la identificación de proteínas expresadas constante y diferencialmente en cada variedad durante su desarrollo. Entre sus resultados encontraron 129 proteínas expresadas diferencialmente durante las diferentes etapas, de las cuales 83 fueron identificadas exitosamente. Las proteínas identificadas pertenecen principalmente a procesos de control de estrés oxidativo, defensa de estrés ambiental y/o patógeno y al metabolismo del carbono y producción de energía.

En este mismo sentido, Faurobert y col (2007) identificaron la variabilidad de proteínas en tomate cherry, determinando las principales variaciones del proteoma durante el desarrollo y maduración de este fruto. La mayor proporción de las proteínas identificadas pertenecen a proteínas implicadas en respuesta a estrés, metabolismo del carbono y carbohidratos, metabolismo de aminoácidos, trasporte de electrones, fotosíntesis y respiración, degradación de proteínas y al metabolismo secundario. Por su parte, Xu y col (2013) elaboraron un extenso mapa del proteoma del pericarpio de 12 genotipos de tomate en dos diferentes estados de desarrollo (expansión celular y rompiente). El análisis mediante espectrometría de masas permitió identificar 506 proteínas que fueron asociadas a diferentes funciones fisiológicas entre las cuales se encontraron proteínas del metabolismo primario,

proteínas en respuesta a estrés, traducción, síntesis de vitaminas, procesos metabólicos celulares, proteínas asociadas con la maduración, proteínas del metabolismo secundario, representando así una amplia diversidad fenotípica y genotípica.

En los últimos años se han realizado algunos estudios de proteómica comparativa para investigar los mecanismos relacionados con el DF en frutos de tomate, los cuales se han enfocado en la identificación de proteínas que responden al estrés por bajas temperaturas.

Page y col (2010) observaron que las proteínas sobreexpresadas en frutos sometidos a bajas temperaturas están asociadas a la tolerancia por congelamiento y que la inhibición de la expresión de proteínas está asociada con los procesos de maduración. En este estudio, las proteínas involucradas en la resistencia al DF fueron proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSPs). En este mismo año, Vega-García y col (2010) realizaron una comparación entre el perfil de proteínas de tomates almacenados a temperaturas de DF y de refrigeración observando una acumulación significativa de dos proteínas relacionadas con respuestas a bajas temperaturas: tioredoxin peroxidasa y una proteína rica en glicina de unión a ARN. Los autores sugieren que ambas proteínas pueden estar actuando para mantener la homeostasis del tejido expuesto a temperatura de daño y la regulación de la expresión de genes a temperaturas bajas. En otro estudio realizado por Sánchez-Bel y col (2012) se llevó a cabo un análisis comparativo entre tomates almacenados a temperaturas de DF y no daño justo antes de la aparición de los síntomas visibles del desorden, con la finalidad de diferenciar entre las proteínas involucradas en los síntomas y las implicadas en la respuesta. La identificación de las proteínas expresadas diferencialmente estuvieron involucradas en dos funciones biológicas importantes: en mecanismos defensivos representados por proteínas de choque térmico de bajo peso molecular y proteínas abundantes al final de la embriogénesis y en reacciones de desacoplamiento de los procesos fotosintéticos, así como en la maquinaria de degradación de proteínas; estas últimas corresponden con las encontradas por Vega-García y col (2010).

Todos estos estudios han sido realizados con el fin de entender las respuestas del fruto a las temperaturas bajas, sin embargo hasta la fecha no se tienen reportes enfocados en la identificación de proteínas asociadas con la tolerancia al DF inducida mediante el uso de tratamientos hidrotérmicos, lo que sugiere la necesidad de realizar un análisis de proteómica y profundizar en el significado funcional de la expresión de proteínas bajo condiciones de tolerancia al estrés por frío y así entender de mejor manera los mecanismos involucrados. Además, es de esperar que el mayor conocimiento de las bases moleculares de los procesos de sensibilidad y aclimatación al frío permitan diseñar estrategias para mejorar la conservación de los frutos sensibles a las bajas temperaturas.

## IV JUSTIFICACIÓN

El tomate es un producto hortofrutícola de gran importancia económica para México ya que ocupa el décimo lugar en producción a nivel mundial, mientras que el estado de Sinaloa ocupa el primer lugar a nivel nacional. Además este fruto es de gran importancia social dada la posibilidad que tiene de utilizarse en forma fresca o procesada industrialmente.

El almacenamiento y distribución poscosecha del tomate involucra el uso de temperaturas bajas, pero desafortunadamente al ser un fruto climatérico es susceptible al DF por lo que su vida de comercio se ve limitada al no poder utilizar temperaturas inferiores a 12°C. Como parte de las estrategias propuestas para aminorar las pérdidas ocasionadas por el DF, se ha optado por la aplicación de un tratamiento hidrotérmico, previo al almacenamiento en frío. Dicho tratamiento ha resultado efectivo en la reducción de los síntomas de este desorden fisiológico al conferirle al fruto mayor tolerancia a las bajas temperaturas sin prejucio de su calidad.

A pesar de este efecto positivo, se tiene poco conocimiento sobre las bases bioquímicas y moleculares que generan dicha tolerancia y existe muy poca información acerca de la expresión de proteínas en respuesta a las bajas temperaturas, así como en la tolerancia inducida al DF. Es por esta razón, y en la idea de aportar información que apoye en el entendimiento del fenómeno que resulta interesante estudiar los cambios en el patrón de expresión de proteínas en frutos de tomate tratados previamente con un tratamiento hidrotérmico antes de ser sometidos a temperaturas de daño por frío (5°C).

#### **V OBJETIVOS**

## A OBJETIVO GENERAL

Determinar cambios en parámetros fisiológicos y en la acumulación de proteínas asociadas con la tolerancia inducida al daño por frío mediante tratamiento hidrotérmico en tomate cv. Imperial (*Solanum lycopersicum* L.).

# **B OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar parámetros de calidad (color en cáscara y firmeza) de frutos de tomate con y sin TH durante su almacenamiento a 5 o 12°C y posterior maduración (21°C).
- Determinar la lixiviación de electrolitos y el contenido de malondialdehído de frutos de tomate con y sin TH durante su almacenamiento a 5°C y determinar su relación con la tolerancia inducida al daño por frío.
- Separar proteínas expresadas diferencialmente entre frutos de tomate con y sin TH expuestos a temperatura de daño por frío (5°C).
- Identificar por espectrometría de masas proteínas expresadas diferencialmente entre frutos de tomate con y sin TH expuestos a temperatura de daño por frío (5°C).

# **VI MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **A MATERIALES**

Se utilizaron frutos de tomate cv. Imperial en estado de madurez fisiológica, los cuales fueron proporcionados por la empresa Agrícola Chaparral, SPR de RL ubicada en Culiacán, Sinaloa, México. Los frutos se seleccionaron con base en uniformidad de color y ausencia de defectos, se lavaron y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (200 ppm) por 3 min; transcurrido ese tiempo fueron escurridos y se dividieron en 2 lotes. Un lote para los frutos control (sin TH) y el otro para los frutos que recibieron el tratamiento hidrotérmico TH (42°C/ 5 min). Posteriormente, cada lote fue divido en 2 grupos, quedando de la siguiente manera: frutos sin TH almacenados a temperatura de no daño (12°C) y de daño (5°C); frutos con TH almacenados a temperatura de no daño (12°C) y a temperatura de daño (5°C). Todos los lotes fueron almacenados durante 20 días, con retiros de muestras cada 10 días para luego ser transferidos a un segundo almacenamiento a temperatura de maduración (21°C) durante 7 días.

## **B MÉTODOS**

## 1 Aplicación del tratamiento hidrotérmico

Los frutos fueron sumergidos durante 5 min en un baño de acero inoxidable que contenía agua a una temperatura de 42°C de acuerdo a lo reportado por Cárdenas-Torres (2013) para tomate cv. Imperial, seguido de un enfriamiento a 25 °C durante 30 min. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el exceso de humedad utilizando toallas de papel.

## 2 Medición de parámetros de calidad

#### a Firmeza

Se determinó de acuerdo a lo reportado por López-Valenzuela (2011). Se cortaron trozos de pericarpio de aproximadamente 1.5 x 1.5 cm de la región ecuatorial de los frutos, retirando las regiones donde se unen los lóculos al pericarpio y el gel intralocular. Cada trozo fue colocado con el pericarpio hacia arriba en la base de un penetrómetro digital Chatillon DFE100 provisto con una punta plana de 11 mm de diámetro que se introdujo en el tejido a una profundidad de 5 mm y a una velocidad de penetración constante de 50 mm min<sup>-1</sup>. La firmeza fue reportada como la fuerza de compresión máxima en Newtons (N). Se utilizaron 5 frutos y en cada uno de ellos se realizaron 7 mediciones.

#### **b** Color

Se determinaron los valores L (luminosidad), a\* (rojo-verde), y ángulo Hue (°H) en base a la escala CIE LAB, en tres puntos equidistantes de la región ecuatorial de cada uno de los 5 frutos utilizando un colorímetro Minolta CR 200 (Minolta, Japón).

# 3 Índice de daño por frío (IDF)

El IDF se estimó de acuerdo con lo reportado por Vega-García y col (2010) utilizando 10 frutos. Los criterios que se utilizaron para evaluar los síntomas en piel y tejido fueron los siguientes: A= coloración no uniforme, B= áreas sudadas, C= marchitamiento, D= picado superficial y E= presencia de pudriciones. Se utilizó una escala hedónica que refleja el nivel de daño, en porcentaje, de cada fruto para cada

criterio (0= ausencia de daño; 1= <10 %; 2= 11-25%; 3 = 26-40%) y el índice de daño por frío se obtuvo mediante la siguiente expresión:

$$IDF = (NDA + NDB + NDC + NDD + NDE) / 5$$

Dónde IDF es el índice de daño por frío y ND es el nivel de daño para cada uno de los síntomas.

#### 4 Lixiviación de electrolitos

La evaluación de electrolitos se realizó siguiendo la metodología reportada por Zhao y col (2009) con algunas modificaciones. Se tomaron cilindros de tejido fresco de la región ecuatorial con un diámetro de 5 y 10 mm de longitud y se utilizó agua desionizada para lavarlos. Después, fueron colocados en 25 mL de una solución de manitol 0.1 M y se incubaron con agitación a 100 ciclos/min durante 2 h a 25°C. Una vez transcurridas las 2 h, se midió la conductividad de la solución con un conductímetro (Hanna instruments EC/TDS modelo HI 98311). Posteriormente los cilindros fueron sometidos a 121°C por 10 min en una autoclave con el fin de liberar el total de electrolitos. Transcurrido el tiempo, las muestras fueron enfriadas a 25°C y se midió la conductividad de las soluciones. La lixiviación de electrolitos fue expresada como el porcentaje de electrolitos lixiviados con respecto al total de electrolitos. Se utilizaron 5 frutos y en cada uno de ellos se realizaron 3 mediciones.

## 5 Contenido de malondialdehído (MDA)

Para la cuantificación del contenido de MDA (peroxidación de lípidos), se siguió la técnica descrita por Hodges y col (1999). Se homogenizó 1 g de tejido congelado

en una mezcla de etanol:agua en una relación 80:20 (v:v) y se centrifugó a 3,000 x g (Eppendorf, 5810R, USA) durante 10 min. A continuación se tomó una alícuota de 1 mL de la muestra que fue añadida en un tubo de ensayo conteniendo 1 mL de solución, la solución (i) –TBA, compuesta de 20% (p/v) ácido tricloroacético y 0.01 % (hidroxitolueno butilado), o bien la solución (ii) +TBA, que contenía todo lo anterior más 0.65 % de ácido tiobarbitúrico. Posteriormente, las muestras se agitaron vigorosamente y se incubaron a 95 °C por 25 min, se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron (3,000 x g durante 10 min) para recuperar el sobrenadante. Se registró la absorbancia a 440, 532 y 600 nm. Los equivalentes de MDA fueron expresados como equivalentes de MDA (nmol•g-1 FF) y calculados de la siguiente manera:

- 1) A= [(Abs 532+TBA)-(Abs 600+TBA) (Abs 532-TBA Abs 600-TBA)]
- 2) B= [(Abs 440+TBA Abs 600+TBA) 0.0571]
- 3) Equivalentes de MDA (nmol•ml-1)=  $(A B / 157,000) 10^6$

Se utilizaron 5 frutos y en cada uno de ellos se realizaron 3 mediciones.

# 6 Preparación de la muestra para la extracción de proteínas

El tejido de tomate mantenido a -70°C fue molido con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Previo a la extracción, el tejido fue sometido a tres lavados para eliminar compuestos que pudieran acomplejarse con las proteínas e impedir su solubilización, según lo reportado por Wang y col (2006) con algunas modificaciones. Para el primer lavado se tomaron 8 g de tejido molido, se homogeneizaron con 10 mL de ácido tricloroacético al 10 % en acetona durante 5 min, posteriormente se

centrifugó la mezcla a 11,000 *g* durante 15 min a 4°C y se retiró el sobrenadante; el residuo se lavó dos veces más, primeramente con acetato de amonio 0.1 M en metanol al 80 % y luego con acetona al 80 % bajo las condiciones anteriores. Finalmente, el tejido lavado se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se secó hasta eliminar los residuos solventes.

## 7 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Wang y col (2006) con algunas modificaciones. Al tejido lavado se le agregó un búfer de extracción fenol:amortiguador SDS (30 % sacarosa, 2 % SDS, 0.1 M Tris-HCL pH  $8.0 \text{ y } 5 \text{ % }\beta$ -Mercaptoetanol) en una relación 1:1. La mezcla se incubó por 5 min y se centrifugó a 16,000 g durante 5 min para separar la fase fenólica, de la cual se precipitaron las proteínas con acetato de amonio 0.1 M en metanol a -20°C durante 30 min. Las proteínas se recuperaron por centrifugación a 16,000 g durante 5 min, la pastilla se lavó con metanol y acetona al 80 % y se secó para eliminar los residuos de solventes.

### 8 Separación de proteínas

La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE). En la primera dimensión, las proteínas se separaron en función de sus puntos isoeléctricos (isoelectroenfoque), mientras que en la segunda dimensión se separaron en función del tamaño en presencia de SDS (SDS-PAGE). Para la primera dimensión, la muestra de proteínas se resuspendió en amortiguador de rehidratación (Urea 8 M, CHAPS 2 %, DTT 10 mM, Anfolitas pH 3-

10) 1 %, Azul de bromofenol 0.01 %). Se cargaron 300 µL del amortiguador de rehidratación que contenían 500 µg de proteína en tiras de 17 cm de pH inmovilizado en un rango de 5-8 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La muestra se cargó en el gel y se dejó rehidratando durante toda una noche, la separación se realizó en un sistema Protean IEF (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando las condiciones de voltaje y tiempo recomendadas por el proveedor (250 V, 20 min; 10 000 V, 2.5 h; 10 000 V, 40 000 V). Previo a la segunda dimensión, las proteínas fueron reducidas con DTT 130 mM en Tris-HCl 0.375 mM pH 8.8, Urea 6 M, Glicerol 20 %, SDS 2 % con agitación durante 10 min, y alquiladas con lodoacetamina 135 mM en Tris-HCl 0.375 mM pH 8.8, Urea 6 M, Glicerol 20 %, SDS 2 % durante 10 min. Las tiras se colocaron en la parte superior de un gel de acrilamida al 12.5 % y la separación se realizó en Tris 25 mM pH 8.3, Glicina 192 mM y SDS 0.1 % a corriente constante (40 mA) durante aproximadamente 14 h. Los geles obtenidos se tiñeron con azul de Coomassie al 0.1 % en 40 % de metanol y 10 % de ácido acético. Posteriormente se destiñeron con metanol-ácido acético-agua (40:10:50 y 7:10:83). Las imágenes de los geles se obtuvieron con un sistema de fotodocumentación ChemicDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las diferencias cuali y cuantitativas se analizaron por medio del programa PDQuest (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La separación y análisis se realizó por triplicado.

### 9 Identificación de proteínas

Las proteínas expresadas diferencialmente entre las muestras se identificaron por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Primeramente se lavaron los geles para eliminar el exceso de colorante azul de Coomassie y posteriormente se

removieron las proteínas de interés utilizando una punta de micropipeta. El pedazo de gel removido se sometió a una serie de lavados con acetonitrilo (50 µL) para eliminar el colorante y se secó al vacío durante 10 min. Las proteínas fueron reducidas por incubación con ditiotreitol (DTT) 10 mM en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0.1 M (1 h/56 °C) y posteriormente alquiladas con iodoacetamida 55 mM en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0.1 M por 45 min a temperatura ambiente. Los geles se lavaron con NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM, se secaron con vacío e incubaron durante aproximadamente 12 h (37°C) en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM conteniendo 0.02 µg/µL de tripsina grado secuenciación (Promega, Madison, WI, EUA). Los péptidos fueron concentrados y desalados utilizando puntas conteniendo resina tipo C18 en la punta (Zip-tip, Milipore, Billerica, MA, EUA). La mezcla de péptidos fue analizada con un sistema LC/MS acoplado con un espectro de masas con trampa de iones (LTQ-XL, Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) utilizando una fuente de iones nanospray (3.0 kV). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna capilar de fase reversa (New Objective) usando un gradiente de 5-80% de acetonitrilo durante 120 min. La adquisición de los espectro de masas se realizó con el programa Xcalibur 2.2 (Thermo Scientific, San José, CA, EUA) en un rango de masa-carga (m/z) de 300-2000, y los iones más intensos fueron fragmentados por disociación inducida por colisión (CID, del inglés Collision Induced Dissociation). Los datos se analizaron con el programa Proteome Discoverer 1.3 usando el algoritmo SEQuest contra una base de datos referenciada. Los parámetros de búsqueda para modificaciones fueron los siguientes: Cisteína carbamidometilada como fija y oxidación de Metionina como variable. Las tolerancias fueron de 1.2 Da para el ión precursor y 0.6 para picos de fragmentación. El espectro MS/MS proporcionó información parcial de la secuencia de los péptidos y éstos fueron comparados con

secuencias de proteínas en las bases de datos.

10 Análisis estadístico

El diseño experimental se realizó de la siguiente manera:

Temperaturas de almacenamiento: temperatura de DF (5°C) y no daño (12°C).

Temperatura de maduración: 21°C.

Tiempo de almacenamiento: 0, 10 y 20 días.

Tiempo de maduración: 7 días.

Tratamiento: Sin TH, Con TH.

Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Fisher con un nivel de

significancia de 0.05. Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico

Statgraphic plus 5.1 (Statistical Graphics, Warrenton, VA).

63

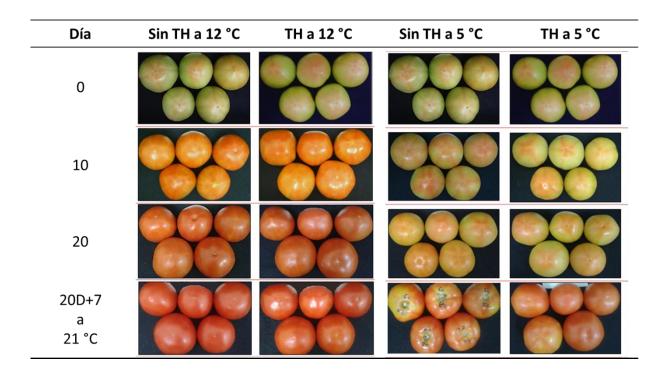
# VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

# A PARÁMETROS DE CALIDAD

#### 1 Color en cáscara

El tomate para su consumo en fresco es valorado fundamentalmente por su uniformidad, madurez y ausencia de defectos, por lo que es importante medir los parámetros que determinan la calidad del fruto. El color en cáscara es uno de los principales aspectos para la aceptación de los frutos ya que es un indicador del grado de madurez de los tomates y se ve fuertemente afectado por la temperatura a la que son almacenados durante el manejo poscosecha.

En la figura 4 se muestran los frutos de tomate seleccionados con y sin tratamiento hidrotérmico almacenados durante 20 días a temperatura de refrigeración (TR, 12°C) o de daño por frío (TDF, 5°C) más un período de maduración a 21°C durante 7 días. Se pueden observar claramente diferencias en los estados de maduración y en la coloración de los frutos entre los diferentes días de almacenamiento y los tratamientos. A medida que aumentan los días de almacenamiento a 12°C los tomates presentan una rápida aparición del color rojo en ambos tratamientos, siendo los tomates sin TH en los que se observa un mayor avance hacia el color rojo con respecto a los tomates con TH. En cuanto a los tomates almacenados a 5°C, el proceso de maduración ocurrió más lento ya que la exposición a las bajas temperaturas provoca una disminución de la velocidad de respiración y del metabolismo del fruto evidenciándose por el retardo en la aparición del color rojo, inclusive en el período de almacenamiento a 21°C. Estas diferencias



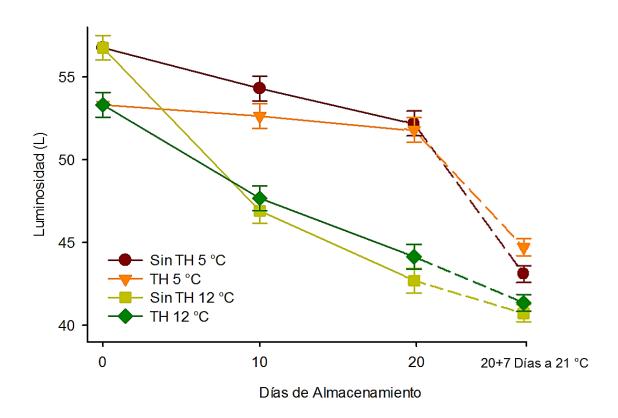
**Figura 4**. Cambios en color y maduración de frutos de tomate con y sin TH almacenados durante 20 días a 12°C y 5°C, más un período de maduración de 7 días a 21°C.

en la coloración durante la maduración se pueden asociar con cambios en el componente acromático  $L^*$ , junto con el descriptor cromático  $a^*$  y con el matiz cromático Hue (°H) (López-Camelo y Gómez 2004).

#### a Luminosidad (L)

La coordenada L\* de la escala CIE LAB recibe el nombre de luminosidad y toma valores desde 0 (negro) hasta 100 (blanco). En la Figura 5 se muestran los valores obtenidos para luminosidad en los tomates almacenados a temperatura de refrigeración (TR) y temperatura de daño por frío (TDF) más un período de maduración de 7 días a 21°C. La luminosidad disminuye conforme transcurre la maduración, como se observa en el gráfico para ambos tratamientos, aunque esta disminución fue más pronunciada en los tomates almacenados a 12°C, lo cual se atribuye a un oscurecimiento asociado con la aparición del color rojo durante el proceso normal de maduración. Por otro lado, en los tomates almacenados a 5°C se observan cambios leves en este parámetro durante los 20 días, resultando en valores significativamente más altos de L\* respecto a los tomates almacenados a 12°C como consecuencia del retraso de la aparición y desarrollo del color ocasionado por el almacenamiento a temperaturas baja; si el almacenamiento a temperatura baja se prolonga, los frutos no consiguen desarrollar por completo el color rojo inclusive al final del período de maduración a 21°C.

Durante el período de maduración a  $21^{\circ}$ C el valor de  $L^{*}$  disminuyó progresivamente independientemente de la temperatura (5 y  $12^{\circ}$ C) y tiempo de exposición al enfriamiento. No se encontraron diferencias significativas entre los

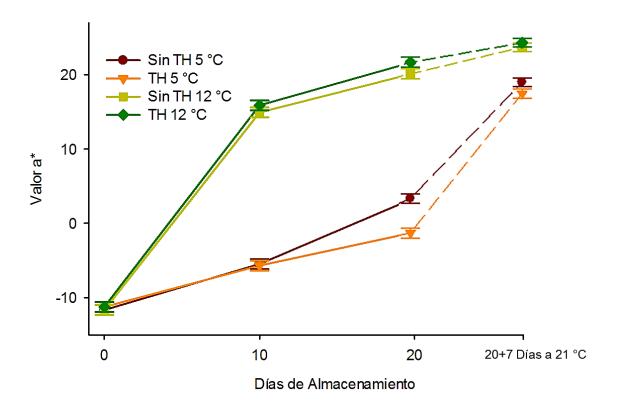


**Figura 5**. Cambios en la luminosidad ( $L^*$ ) de frutos de tomate Sin TH y con TH almacenados durante 20 días a 12°C y 5°C, más un período de maduración de 7 días a 21°C. Las barras verticales indican LSD= 0.75 para 12 y 5°C y LSD= 0.51 para 21°C ( $\alpha$ =0.05).

tratamientos en los tomates almacenados a TR, pero en aquellos almacenados a TDF los frutos con TH presentaron valores de  $L^*$  significativamente (p<0.05) mayores con respecto a los sin TH.

#### b Valor a (a\*)

Los cambios de color más importantes se dan en el componente a\* ya que nos indica el cambio del color verde a rojo como consecuencia de la degradación de clorofila y posterior biosíntesis de licopeno, por lo que se espera que el valor a\* aumente conforme transcurre el tiempo de almacenamiento. En la Figura 6 se muestran los valores de a\* obtenidos durante la maduración de los tomates con y sin TH almacenados a 5°C y 12°C durante 20 días, más un período de maduración de 7 días a 21°C. Se observó un aumento drástico del valor a\* en los tomates almacenados a 12°C como consecuencia de la degradación de clorofila y posterior biosíntesis de licopeno producto de la maduración, mientras que los frutos almacenados a 5°C mostraron valores menores que los frutos almacenados a 12°C durante todo el almacenamiento, esto puede atribuirse a la conservación de tonos de color verde en el fruto consecuencia del almacenamiento a temperaturas más bajas, que disminuye la velocidad con la que se llevan a cabo los procesos involucrados en la maduración de los frutos de tomate, como son la degradación de clorofila y síntesis de licopeno. A este respecto, Soto-Zamora y col (2005) reportaron que durante el almacenamiento a 4°C de frutos de tomate cv. Rhapsody la clorofila no era degradada por completo y al mismo tiempo se daba un desarrollo mínimo de licopeno como consecuencia de este almacenamiento en frío. En otro estudio realizado por López-Espinoza (2008) se encontró que para tomate cv. Imperial



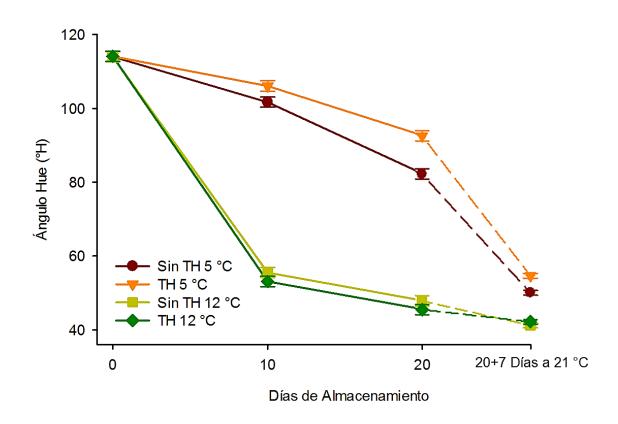
**Figura 6**. Cambios en el parámetro  $a^*$  de frutos de tomate Sin TH y con TH almacenados durante 20 días a 12°C y 5°C, más un período de maduración de 7 días a 21°C. Las barras verticales indican LSD= 0.68 para 12 y 5°C y LSD= 0.60 para 21°C ( $\alpha$ =0.05).

almacenado a 5°C, el valor *a*\* presentaba valores más bajos al compararse con frutos de tomate almacenados a 12°C.

Solamente se observaron diferencias significativas (p<0.05) entre los tomates con y sin TH después de ser almacenados durante 20 días a temperatura baja, siendo los tomates sometidos al TH los que presentaron menores valores de a\* con respecto a los Sin TH, comportamiento similar al observado por Lurie y col (1997) quien reportó valores menores del parámetro a\* en frutos de tomate cv. Imperial que recibieron un TH. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en los tomates almacenados a 12°C, lo que indica que el TH no afecta al color en estos tomates.

# c Ángulo Hue (°H)

La Figura 7 muestra los valores de Hue (°H) obtenidos durante la maduración de los tomates con y sin TH almacenados a 5°C y 12 °C durante 20 días, más un período de maduración de 7 días a 21 °C. El ángulo Hue representa numéricamente los cambios de color asociados al proceso de maduración, por lo que menores valores de °H indican un mayor avance al rojo, como se observa en la Figura 6. Se puede apreciar una disminución pronunciada en los valores de °H en los tomates almacenados a 12°C como consecuencia de los cambios de color durante la maduración, mientras que en los tomates almacenados a 5 °C el cambio de color fue más lento evidenciándose con mayores valores de °H. Se observaron diferencias significativas entre los tomates con TH y sin TH almacenados durante 20 días a temperatura baja, inclusive durante el período de maduración a 21°C, siendo los tomates con TH los que presentaron valores mayores de °H con respecto a los sin

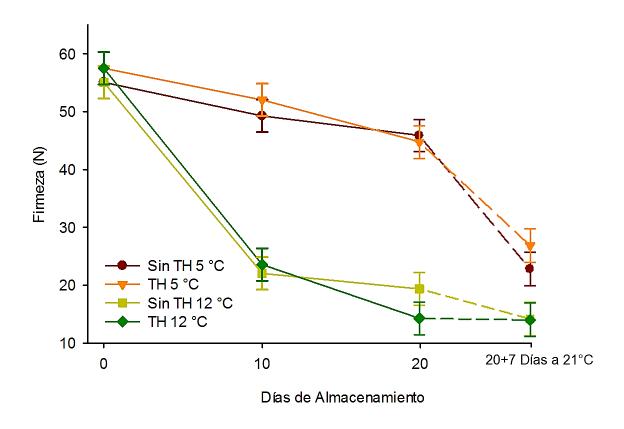


**Figura 7**. Cambios en el ángulo de matiz Hue (°H) de frutos de tomate Sin TH y con TH almacenados durante 20 días a 12°C y 5°C, más un período de maduración de 7 días a 21°C. Las barras verticales indican LSD= 1.38 para 12 y 5°C y LSD= 0.64 para 21°C ( $\alpha$ =0.05).

TH, lo cual se atribuye a que los tratamientos térmicos disminuyeron la síntesis de licopeno en los frutos, sin embargo cuando fueron expuestos a temperatura de maduración recuperaron su coloración roja. Este comportamiento fue observado previamente por Henríquez y col (2005) en tomates sometidos a diferentes tratamientos con calor. Los autores, lo atribuyeron a la inhibición de la síntesis de licopeno cuando el tratamiento con calor era muy prolongado. En general, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en los tomates almacenados a 12°C, lo que indica que el TH no afecta el desarrollo de color de los frutos.

#### 2 Firmeza

La firmeza de frutos de tomate es un parámetro que mide la resistencia de penetración de los tejidos. En la Figura 8 se muestran los valores de firmeza (N) obtenidos durante la maduración de los tomates con y sin TH almacenados a 5 °C y 12 °C por 20 días, más un período de maduración de 7 días a 21 °C. En ambos tratamientos y temperaturas se observa que la firmeza disminuye progresivamente durante el almacenamiento, lo cual se puede relacionar con el avance en el estado de maduración de los frutos, lo cual explica la mayor pérdida de firmeza observada en los frutos almacenados a temperatura de no daño o crítica (12 °C). En este sentido, en frutos expuestos a temperatura baja se observa que la pérdida de firmeza ocurre más lento, lo cual se atribuye a la disminución de la velocidad de respiración y por ende de maduración, pero cuando los frutos son transferidos a una temperatura superior (21°C) se observó una drástica disminución en la firmeza.



**Figura 8**. Cambios en la firmeza de frutos de tomate Sin TH y con TH almacenados durante 20 días a 12°C y 5°C, más un período de maduración de 7 días a 21°C. Las barras verticales indican LSD= 2.81 para 12 y 5°C y LSD= 2.90 para 21°C ( $\alpha$ =0.05).

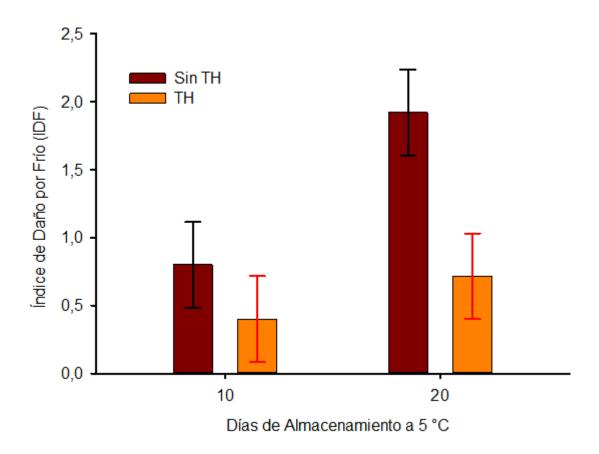
La pérdida de firmeza de los frutos durante la maduración puede atribuirse principalmente a depolimerización y solubilización de poliurónidos en la lámina media de las paredes celulares, conduciendo a la pérdida progresiva de la cohesión célulacélula (Cárdenas-Torres 2013). El hecho de que los frutos almacenados a 5°C presentaran valores de firmeza superiores a los de aquellos almacenados a 12°C aún después de 7 días de maduración puede ser el resultado de un evento extendido. Este inicia con un retraso en la velocidad de maduración ocasionado por exposiciones cortas a temperatura baja que se vuelve más drástico a medida que el período de exposición se prolonga, llegando a presentarse áreas duras que ya no maduran y que se consideran un síntoma de daño por frío, lo que genera una mayor firmeza en esa parte del tejido (López-Espinoza 2008). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tomates con y sin TH para ambas temperaturas, inclusive durante el periodo de maduración a 21°C; este comportamiento también fue observado por Cárdenas-Torres (2013) en tomates con y sin TH (5 min, 42°C) almacenados a 5°C y 12°C y por Henríquez y col (2005) en tomates sometidos a diferentes tratamientos térmicos. En ambos estudios no se encontraron diferencias significativas entre los frutos tratados y almacenados a temperatura de DF, lo que sugiere que no existe un efecto negativo del TH en la pérdida de firmeza que sufren los frutos durante la maduración.

# **B ÍNDICE DE DAÑO POR FRÍO**

El índice de daño por frío (IDF) se calculó con base en una escala hedónica que incluye los principales síntomas de DF en frutos de tomate. Las evaluaciones se realizaron al retirar los frutos después de almacenarlos durante 10 y 20 días a

temperatura baja, así como después de un período de maduración a 21°C por 7 días. Los síntomas fueron visibles una vez que los frutos fueron expuestos a temperatura de maduración (21°C), los cuales se presentaron sólo en los frutos almacenados a 5°C y el grado de daño aumentó conforme el tiempo de maduración incrementó, siendo más severo en aquellos frutos con mayor tiempo de exposición a la temperatura baja.

En la Figura 9 se muestra la evaluación del índice de daño por frío durante la maduración (21°C) de los tomates con y sin TH previamente almacenados a temperatura de DF. En los frutos almacenados a 5°C por 10 días el IDF no presentó diferencias significativas (p>0.05) entre los tratamientos sin TH y TH durante el almacenamiento a 21°C; sin embargo, cuando los frutos se almacenaron por 20 días a temperatura baja se observó un valor de IDF significativamente mayor en tomates sin TH con respecto a los tratados térmicamente; los síntomas visuales del daño fueron maduración irregular, marchitamiento y un mayor número de tomates con pudriciones (Figura 10). En el caso de los frutos sometidos al TH presentaron una maduración más uniforme y no mostraron marchitez, lo cual se reflejó en un menor valor de IDF, demostrando así el efecto benéfico de la aplicación del TH en la disminución de los síntomas de DF. La observación de una mayor severidad de los síntomas conforme se prolonga la exposición del tejido a la temperatura baja coincide con lo reportado por Ding y col (2002) para frutos de tomate expuestos a 5°C durante 14, 21 y 28 días, así como con lo reportado por Lurie y Sabehat (1997) para tomate cv. Daniella almacenado a 2°C durante 7, 11, 14 y 21 días y transferido a 20°C por 10 días. Por otro lado, Cruz-Mendívil (2015) reportó que la aplicación de



**Figura 9**. Índice de daño por frío (IDF) de frutos de tomate Sin TH y con TH almacenados durante 10 y 20 días a 5°C, seguido de un periodo de maduración por 7 días a 21°C. Las barras verticales indican LSD= 0.63 ( $\alpha$ =0.05).





**Figura 10**. Síntomas de daño por frío observados en frutos de tomate sin y con TH almacenados durante 20 días a 5°C, seguido de un periodo de maduración por 7 días a 21°C.

un TH (7 min, 40°C) en tomate Micro-Tom redujo de manera significativa los síntomas, mientras que Cárdenas-Torres (2013) también observó un efecto benéfico del TH en frutos de tomate cv Imperial sometidos por 5 min a 42°C y almacenados durante 25 días a 5°C.

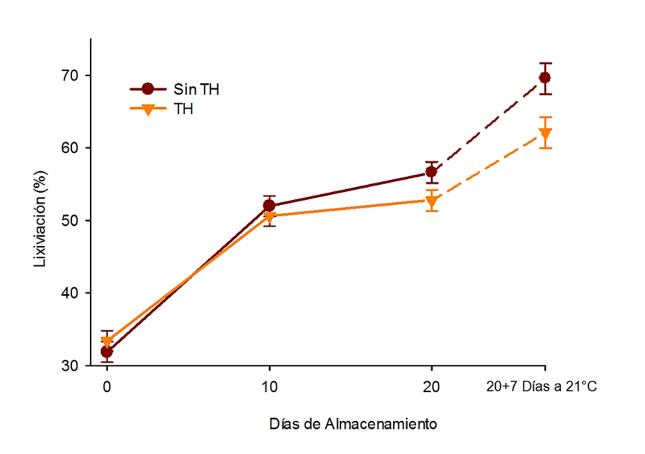
El IDF refleja directamente el grado de desarrollo de los síntomas del DF y ha sido ampliamente utilizado en el estudio de este desorden en distintos frutos para juzgar la tolerancia al frío. En este sentido, los resultados del presente estudio sugieren que el TH confiere tolerancia al DF en los frutos de tomate ya que presentaron una menor incidencia de los síntomas asociados al mismo.

# C CAMBIOS EN PARÁMETROS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS CON ESTRÉS POR BAJA TEMPERATURA Y TOLERANCIA INDUCIDA AL DAÑO POR FRÍO

#### 1 Lixiviación de electrolitos

El mal funcionamiento de las membranas celulares a temperaturas bajas es considerado el evento molecular primario, el cual está frecuentemente relacionado con el incremento de la permeabilidad de las membranas, por lo que la lixiviación de electrolitos ha sido utilizada para evaluar la resistencia al daño por frío en los tejidos (Zhang y col 2013).

En la Figura 11 se muestran los valores obtenidos para lixiviación de electrolitos en los tomates almacenados a temperatura de DF (5°C) durante 20 días, más un período de maduración de 7 días a 21°C. En el gráfico se observa que la fuga de electrolitos aumenta en forma gradual conforme avanza el tiempo de almacenamiento a 5°C, siendo más pronunciado este aumento en los frutos sin TH



**Figura 11**. Lixiviación de electrolitos en frutos de tomate Sin TH y con TH almacenados durante 20 días a 5°C, más un período de maduración de 7 días a 21°C. Las barras verticales indican LSD= 1.41 a 5°C y LSD= 0.44 a 21°C ( $\alpha$ =0.05).

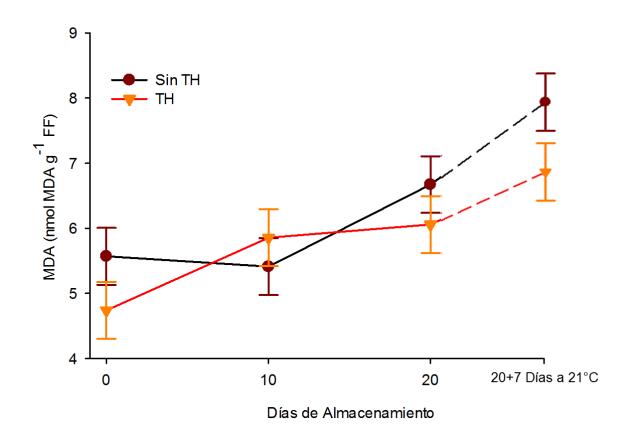
después de 10 días; la fuga de electrolitos se incrementó considerablemente al transferir los frutos a temperatura de maduración. Se pudieron observar diferencias significativas (p<0.05) al día 20 y 20+7 entre los tomates con y sin TH, donde los frutos con TH tuvieron una menor fuga de electrolitos. Este mismo comportamiento fue observado por Cárdenas-Torres (2013) en tomates cv. Imperial con y sin TH almacenados a temperatura de DF, así como por Malacrida y col (2006) y por Cruz-Mendívil (2015) en tomate cv. Micro-Tom almacenados a 4 y 5°C, respectivamente. Estos autores sugieren que el porcentaje de lixiviación de electrolitos se incrementa en los frutos sometidos a temperaturas bajas como consecuencia del DF ya que guarda una alta correlación con el IDF, comportamiento observado en este estudio.

Los resultados obtenidos en este trabajo también indican que el TH brindó protección a los frutos, evidenciándose con valores menores de porcentaje de lixiviación con respecto a los frutos no tratados. Esta reducción en la fuga de electrolitos podría estar asociada con una tolerancia al DF en los frutos inducida por la aplicación del TH.

#### 2 Contenido de malondialdehído (MDA)

El MDA es uno de los productos finales de la peroxidación de lípidos. La magnitud de la peroxidación depende del grado de estrés por frío sufrido por los frutos y del tiempo de exposición a este (Zhang y col 2013).

En la Figura 12 se muestran los valores obtenidos para el contenido de MDA. El almacenamiento a temperatura baja ocasionó un aumento en el contenido conforme transcurrieron los días de almacenamiento en frío. Estos resultados demuestran que



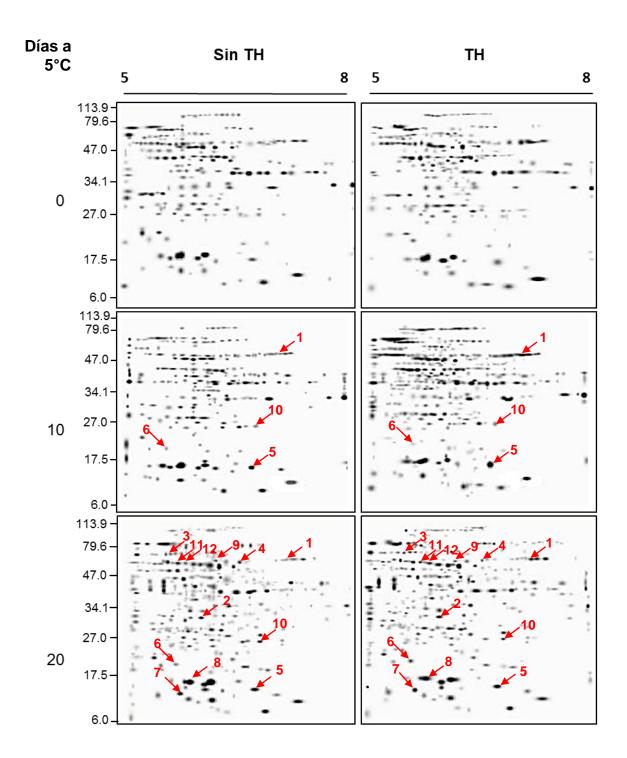
**Figura 12**. Contenido de malondialdehido (MDA) en frutos de tomate Sin TH y con TH almacenados durante 20 días a 5°C, más un período de maduración de 7 días a 21°C. Las barras verticales indican LSD= 2.66 a 5 °C y LSD= 20.4 a 21°C ( $\alpha$ =0.05).

el contenido de MDA en los frutos Sin TH y con TH no cambia significativamente durante los primeros 20 días de almacenamiento, pero se incrementó grandemente cuando los frutos fueron puestos a temperatura de maduración (21°C). Después de 7 días a 21°C, los frutos sometidos al TH presentaron valores de MDA significativamente (p<0.05) menores que los no tratados. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Cárdenas-Torres (2013) en tomate cv. Imperial y por Malacrida y col (2006) en tomate cv. Micro Tom expuesto a un TH almacenado a temperatura de DF y no daño. En ambos estudios se demostró la importancia de la aplicación de un TH en la inducción de la tolerancia al DF, lo cual se vio reflejado en la reducción de los síntomas visuales de este desorden.

# D CAMBIOS EN LA ACUMULACIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADOS CON ESTRÉS POR BAJA TEMPERATURA Y TOLERANCIA INDUCIDA AL DAÑO POR FRÍO

A partir de tejido de frutos con y sin TH almacenados a 5°C durante 0, 10 y 20 días se obtuvieron mapas bidimensionales de proteínas en el rango de pl de 5 a 8, los cuales fueron analizados para detectar cambios en la expresión asociados al estrés y tolerancia inducida al daño frío. Se seleccionó este rango de pl por ser el que permitió la separación de una mayor cantidad de proteínas.

En la Figura 13 se muestran los mapas bidimensionales de proteínas de pericarpio de frutos de tomate con y sin TH almacenados durante 0, 10 y 20 días a 5°C, donde las flechas indican las proteínas que se expresaron diferencialmente entre los tratamientos con y sin TH durante los días de almacenamiento en frío.

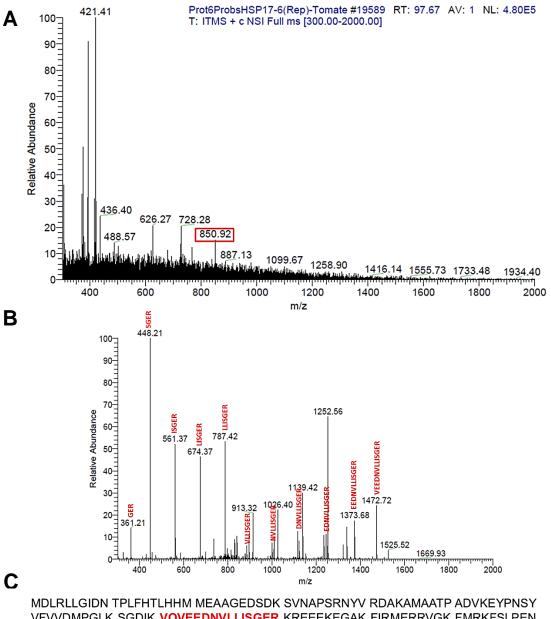


**Figura 13.** Cambios de expresión de proteínas en frutos de tomate con y sin TH almacenados a 5°C durante 0, 10 y 20 días. Las manchas señaladas por flechas indican las proteínas expresadas diferencialmente entre los frutos sin TH y con TH, cuya identificación por LC-MS se indica en el Cuadro 5.

El análisis de cada uno de los mapas bidimensionales con el programa PDQuest detectó alrededor de 300 proteínas, de las cuales solo 4 se encontraron expresadas diferencialmente entre los mapas de los frutos sin TH y con TH almacenados por 10 días a 5°C, mientras que en frutos almacenados por 20 días a 5°C se encontraron adicionalmente 13 proteínas expresadas diferencialmente para un total de 17 (Figura 13). Debido a la poca abundancia de algunos de los polipéptidos, sólo en 13 de las 17 proteínas que difieren entre los mapas con y sin TH fue posible obtener espectros de masas en tándem aptos para su utilización en la búsqueda en las bases de datos.

En la Figura 14 se muestra la identificación por espectrometría de masas en tándem de la proteína indicada con el número 5 en la Figura 13. En la Figura 14A se presenta la huella peptídica de la proteína obtenida en el primer analizador de masas. El ión con una relación masa / carga (m/z) de alrededor de 850.92 (cuadro rojo) fue uno de los que se seleccionó para inducir su disociación y posterior análisis en el segundo analizador de masas; la Figura 14B muestra el espectro MS/MS de este ión, donde además se indica la secuencia parcial de aminoácidos predicha para algunos de los iones resultantes de la disociación.

La búsqueda en las bases de datos determinó que este péptido forma parte de una proteína de bajo peso molecular de clase II (sHSP clase II 17.6 kDa), cuya secuencia completa se indica en la Figura 14C. La identidad y función de las proteínas asociadas al estrés por frío y que pudieron ser identificadas por espectrometría de masas se muestra en el Cuadro 5.



VFVVDMPGLK SGDIK VQVEEDNVLLISGER KREEEKEGAK FIRMERRVGK FMRKFSLPEN ANTDAISAVC QDGVLTVTVQ KLPPPEPKKP KTIEVKVA

Figura 14. Identificación por espectrometría de masas de la proteína 5 indicada en la Figura 13. A) Huella peptídica de la proteína después de su digestión con tripsina. B) Espectro MS/MS del ión encerrado con un óvalo en la Figura A. C) Secuencia completa de aminoácidos de la proteína identificada (las letras en negritas indican la secuencia del péptido seleccionado en A).

Cuadro 5. Identidad y función de las proteínas asociadas al daño por frío en tomate cv. Imperial sin TH y con TH almacenados durante 20 días a 5°C.

No.	ID Base de datos	Descripción	Función	pl/pM (kDa) Experimental	pl/pM (kDa) Teórico
1 T	P20765	Subunidad grande de Rubisco	Fotosíntesis	7.3/57.1	7.02/52.9
2 <sub>TH</sub>	Q9XEX8	Remorina 1	Patogénesis	6.1/32.4	5.68/21.8
3 ∄	K4CWE4	HSP60	Estrés y defensa	5.7/64.7	5.63/61.5
4 SinTH	Q8GZD8	Leucino aminopeptdasa 2 cloroplástica	Procesamiento de proteínas	6.6/56.8	7.8/60.2
5 <sup>™</sup>	Q96489	sHSPclase I 17.6 kDa	Estrés y defensa	6.8/15.7	6.8/17.6
<sub>Н</sub> 9	gi 308419 38	Tioredoxin peroxidasa	Estrés oxidativo	5.8/21.5	5.2/17.4
7 TH	K4B3H9	Proteína rica en glicina que se enlaza al ARN Isoforma 1	Regulación de la expresión de genes	5.8/14.9	5.71/17.3
8 표	Q9SYU8	sHSP clase I 17.7 kDa	Estrés y defensa	6.3/18.1	5.9/20.9
9 STinH	gi 410634	Subunidad II del complejo citocromo c reductasa/peptidasa de procesamiento mitocondrial	Respiración/procesamiento de proteínas	6.3/59.1	6.2/59.3
10 SinTH	gi 777454 58	Triosa fosfato isomerasa	Energía y metabolismo de carbohidratos	6.9/27.8	5.7/27
11 TH	K4CBD6	Xilosa isomerasa	Energía y metabolismo de carbohidratos	6.0/56.5	5.8/44.6
12 SinTH	P26300	Enolasa	Energía y metabolismo de carbohidratos	6.0/54.9	5.95/47.8

Los superíndices indican los frutos o tejidos en los que la expresión de la proteína fue mayor (Sin TH, sin tratamiento hidrotérmico, TH, tratamiento hidrotérmico

Entre las proteínas identificadas en estos mapas (Figura 13, Cuadro 5), seis estuvieron relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y la obtención de energía [Rubisco, # 1; triosa fosfato isomerasa (TpI), # 10; xilosa isomerasa, # 11; enolasa, # 12; subunidad II del complejo citocromo c reductasa/peptidasa de procesamiento mitocondrial, # 9], cuatro estuvieron relacionadas con respuesta al estrés y defensa [proteína de choque térmico (HSP60, # 3); proteína de choque térmico de bajo peso molecular clase II (sHSP clase II 17.6 kDa), # 5; proteína de choque térmico de bajo peso molecular clase I (sHSP clase I 17.7 kDa), # 8 y tioredoxin peroxidasa 1 (Tpx1), # 6], una relacionada con patogénesis [Remorina 1 (REM), # 2], una relacionada con el procesamiento de proteínas [Leucino aminopeptidasa 2 cloroplástica (LAP), # 4], y por último una relacionada con la regulación de la expresión de genes [proteína rica en glicina que se enlaza al ARN (GR-RBP), # 7]. El análisis y discusión de estos resultados se presenta en la siguiente sección.

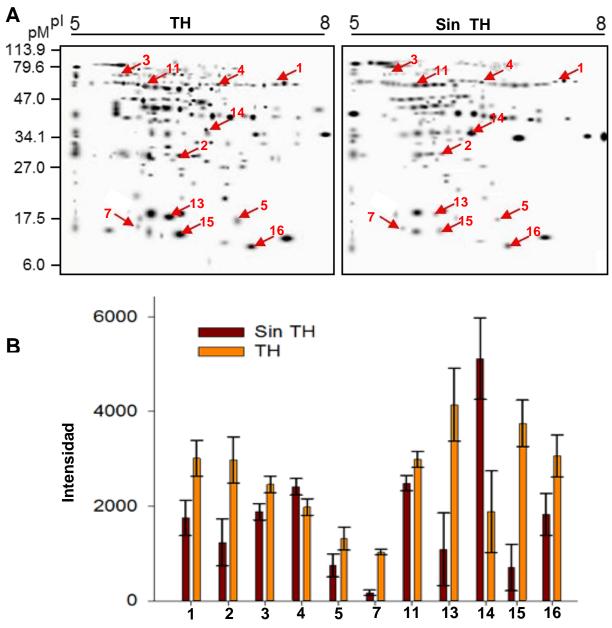
Debido a que el daño por frío es un desorden que depende del tiempo de exposición a las temperaturas bajas y sus síntomas son visibles al exponer los frutos a temperaturas mayores que la crítica, se analizaron los cambios de expresión de proteínas de frutos de tomate sin TH y con TH almacenados por 20 días a 5°C y madurados por 7 días a 21°C, ya que en este punto hubo un mayor desarrollo de síntomas causados por la exposición al frío de acuerdo a lo reportado anteriormente en el índice de daño por frío (Figuras 10-11).En la Figura 15 se muestran los cambios en la acumulación de las proteínas extraidas de frutos de tomate sin TH y con TH almacenados por 20 días a 5°C y madurados por 7 días a 21°C. El análisis

densitométrico (Figura 15A) permitió identificar 20 proteínas expresadas diferencialmente, de las cuales 7 fueron identificadas previamente por espectrometría de masas en frutos sin y con TH almacenados solamente a 5°C. Estas proteínas corresponden a Rubisco (#1), Remorina 1 (REM, #2), proteína de choque térmico (HSP60, #3), Leucin-aminopeptidasa 2 cloroplástica (LAP, #4), proteína de choque térmico de bajo peso molecular clase II (sHSP clase II 17.6 kDa, #5), proteína rica en glicina de unión a ARN (GR-RBP, #7) y xilosa isomerasa (# 11).

De las otras 13 proteínas expresadas diferencialmente, solo 4 lograron identificarse por alineamiento con secuencias reportadas en las bases de datos; la identidad del resto de las proteínas no pudo precisarse debido a la poca abundancia de los péptidos y/o la ambigüedad en los resultados arrojados por los algoritmos de búsqueda. Las proteínas identificadas corresponden a una proteína relacionada con patogénesis STH-2 (#13), lactoil-glutation liasa (#14), superóxido dismutasa (#15) y nucleósido difosfato kinasa (#16). En el Cuadro 6 se enlistan estas proteínas junto con las 7 identificadas previamente. Su análisis y discusión se presenta en la siguiente sección.

# 1 Proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y energético a Rubisco

La enzima ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco) tiene una función dual: como carboxilasa, mediando la asimilación del CO2 fotosintético, y como oxigenasa, catalizando la primera etapa de la ruta de fotorespiración en plantas (Ahsan y col 2007).



**Figura 15**. Cambios de expresión de proteínas en frutos de tomate sin y con TH almacenados por 20 días a 5°C más 7 días a 21°C. A) Geles bidimensionales representativos mostrando las proteínas acumuladas diferencialmente (flechas) entre los tomates sin TH y con TH, las cuales fueron identificadas por espectrometría de masas en tándem y se enlistan en el Cuadro 6. Los pesos moleculares en kDa se muestran a la izquierda de la imagen y el rango lineal de los puntos isoeléctricos (pl) se muestra arriba. B) Cuantificación de las proteínas acumuladas diferencialmente entre los tomates sin y con TH almacenados por 20 días a 5°C más 7 días a 21°C. La intensidad de la proteína es el promedio de tres réplicas. Las barras verticales indican el LSD ( $\alpha$ =0.05). Las medias son diferentes significativamente cuando las barras no se traslapan horizontalmente.

**Cuadro 6.** Identidad y función de las proteínas asociadas al daño por frío en tomate cv. Imperial durante la maduración a 21°C de frutos de tomate sin TH y con TH almacenados previamente por 20 días a 5°C.

No.	ID	Descripción	Función	pl/pM (kDa) Experimental	pl/pM (kDa) Teórico
<u>+</u>	P20765	Subunidad grande de Rubisco	Fotosíntesis	7.3/57.1	7.02/52.9
2 <sup>TH</sup>	Q9XEX8	Remorina 1	Patogénesis/maduración	6.1/32.4	5.68/21.8
3 <sup>TH</sup>	K4CWE4	HSP60	Estrés y defensa	5.7/64.7	5.63/61.5
48іпТН	Q8GZD8	Leucin-aminopeptidasa 2 cloroplástica	Procesamiento de proteínas	6.6/56.8	7.8/60.2
5 <sub>TH</sub>	Q96489	sHSPclase I 17.6 kDa	Estrés y defensa	6.8/15.7	6.8/17.6
7 <sup>тн</sup>	K4B3H9	Proteína rica en glicina que se enlaza al ARN Isoforma 1	Regulación de la expresión de genes	5.8/14.9	5.71/17.3
11 <sup>TH</sup>	K4CBD6	Xilosa isomerasa	Energía y metabolismo de carbohidratos	6.0/56.5	5.8/44.6
13 <sup>TH</sup>	K4CWC4	Proteína relacionada con patogénesis 10	Patogénesis	6.1/21	5.74/17.4
14 <sup>SinTH</sup>	K4B9T4	Lactoil-glutation liasa	Detoxificación	8.98/9.9	7.09/38.5
15 <sup>TH</sup>	K4AX22	Superóxido dismutasa	Estrés y defensa	6.3/15.2	5.87/15.3
16 <sup>TH</sup>	P47921	Nucleósido difosfato kinasa	Metabolismo	12.7/7.	15.7/7.43

Los superíndices indican los frutos o tejidos en los que la expresión de la proteína fue mayor (Sin TH, sin tratamiento hidrotérmico, TH, tratamiento hidrotérmico

Rubisco está compuesta de ocho subunidades grandes de 55 kDa (codificadas por el gen rbcL cloroplástico) y ocho subunidades pequeñas de 15 kDa (codificadas por la familia de genes nucleares rbcS) (Spreitzer y Salvucci 2002; Andersson y Taylor 2003).

Esta enzima generalmente se degrada rápida y selectivamente durante las etapas tempranas de la senescencia natural o inducida por estrés (Ferreira y col 2000). Diversos reportes indican la disminución en la abundancia y actividad de rubisco bajo diferentes tipos de estrés (Majumdar y col 1991; Rao y col 1995; Parry y col 2002; Yan y col 2006; Ahsan y col 2007). En el presente estudio la abundancia de esta proteína fue mayor en el tejido con TH después de 10 y 20 días de almacenamiento en frío (Figura 12), resultado que también se observó después de que los frutos fueron madurados a 21°C por 7 días (Figura 14), lo que sugiere un efecto protector del tratamiento térmico sobre la estabilidad e integridad de esta proteína y/o el cloroplasto durante el estrés por frío.

Los resultados de color mostraron que los frutos de tomate con TH almacenados a 5°C presentaron valores menores de a\* y valores mayores de °H (Figuras 6-7), atribuible a una menor degradación de clorofila, lo cual apoya la idea de que el tratamiento térmico brinda protección al cloroplasto y por consiguiente a sus componentes.

#### b Triosa fosfato isomerasa (Tpl)

La enzima triosa fosfato isomerasa (TPI) cataliza la isomerización entre dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato y es esencial en la ruta de

glicólisis. Además, esta reacción se une a casi todas las rutas metabólicas que involucran triosas fosfato, como gluconeogénesis, biosíntesis de ácidos grasos, ruta de las pentosas fosfato y fijación del dióxido de carbono fotosintético, por lo que esta enzima es de vital importancia tanto en procariotas como eucariotas (Miernyk 1990).

La expresión de TPI fue mayor en los frutos sin TH incluso antes de que el daño fuese visible, es decir, después de 10 días a 5°C; mientras que la mayor acumulación de esta enzima se observó al día 20 de almacenamiento en frío (Figura 12, # 10), lo que nos sugiere que ésta es una enzima que de manera general responde al estrés por la temperatura baja sin estar directamente relacionada con los síntomas de DF. La expresión diferencial de esta enzima antes de la aparición de los síntomas sugiere que el incremento en su acumulación es una respuesta celular para tratar de proteger los tejidos del estrés por frío.

El incremento en la acumulación de esta enzima bajo diferentes condiciones de estrés ha sido reportado previamente en otras especies. Umeda y col (1994) encontraron que algunas enzimas involucradas en las rutas de generación de ATP, incluyendo la TPI, incrementaron su expresión en células de arroz cultivadas en suspensión bajo condiciones de estrés salino. Asimismo, Graumman y col (1996) reportaron que la expresión de la enzima TPI en células de *Bacillus subtilis* se indujo en respuesta al choque por frío y estrés salino. Por otra parte, Riccardi y col (1998) analizaron los cambios en proteínas en hojas de maíz debidos al déficit progresivo de agua, encontrando entre sus resultados la acumulación de la enzima TPI en respuesta a dicho estrés. Además, Rodríguez-Vargas y col (2002) publicaron que la expresión del gen TPI1 en S. cerevisiae es inducida por el frío y algunos otros tipos

de estrés. Con la finalidad de entender los cambios moleculares asociados al estrés por frío en plantas, Cho y col (2007) analizaron el proteoma de plantas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a temperatura baja por periodos largos de tiempo, encontrando que la TPI fue una de las enzimas que se sobreexpresaron en el tejido como consecuencia de la exposición al frío.

En un estudio realizado por Vega-García (2010) en tomate cv. Imperial almacenado a temperatura de DF (5°C) y temperatura de refrigeración (12°C), encontraron que el incremento en la expresión de esta proteína ocurrió después de los 15 y 25 días de almacenamiento a temperatura de DF, sugiriendo que está enzima juega un papel importante en la respuesta a las temperaturas bajas, lo cual corresponde con los resultados del presente estudio donde se observó una mayor acumulación de esta enzima en frutos sin TH después de 10 y 20 días de almacenamiento a 5°C.

Malacrida y col (2006) en un estudio realizado en tomate Micro-Tom sometido a temperaturas de DF y no daño, reportaron que la tasa de respiración de los frutos de tomate expuestos durante 28 días a 4°C era significativamente mayor con respecto a los tomates almacenados a temperatura de no daño. Estos autores sugieren que la mayor acumulación de TPI podría ser el resultado de una eficiencia celular baja en la producción de energía desencadenada por un daño estructural severo.

La acumulación de esta enzima parece ser necesaria para el ajuste de las rutas metabólicas en respuesta a diferentes tipos de estrés con el fin de mantener la homeostasis celular (Rodríguez-Vargas y col 2002; Cho y col 2007), probablemente

por la reducción de la cinética de los procesos enzimáticos de la célula a temperatura baja (Guy 1999).

#### c Xilosa isomerasa

Otra de las proteínas expresadas diferencialmente fue xilosa isomerasa, enzima que utiliza como sustrato a la D-xilosa, un monosacárido natural de las plantas, participando así en el metabolismo de carbohidratos y en particular en la ruta metabólica de las pentosas-fosfato, catalizando la conversión de D-xilosa a D-xilusa (UniProt 2015).

En el presente estudio se observó una mayor acumulación de esta enzima en los tejidos con TH (Figura 14B, # 11), lo cual pudiera estar relacionado con la activación de la ruta metabólica de las pentosas fosfato, la cual es la fuente principal de equivalentes reductores (NADPH) necesarios para las reacciones de biosíntesis y sistema antioxidante de la célula. En este sentido, el metabolismo de carbohidratos es esencial en la biosíntesis de moléculas antioxidantes que son cruciales para la protección de las células vegetales contra el estrés oxidativo (Couée y col 2006). Liu y col (2013) sugieren que el metabolismo de carbohidratos juega un papel importante en la mitigación del estrés oxidativo facilitando la acumulación de las proteínas de choque térmico, así como de moléculas antioxidantes que contribuyen de esta manera a mantener la integridad de las membranas y la función de las proteínas.

#### d Enolasa

Otra de las proteínas identificadas y que participa en el metabolismo de carbohidratos fue enolasa. Esta enzima cataliza la conversión de 2-fosfoglicerato en

fosfoenolpiruvato durante la glucólisis, por lo que juega un papel importante en la degradación de carbohidratos, aunque también cataliza la reacción reversible que es utilizada en la ruta de gluconeogénesis (Cayir y col 2014).

Muchos estudios han indicado cambios en la abundancia de algunas enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos en respuesta al estrés por frío. En general, se ha observado una mayor acumulación de enolasa a bajas temperaturas. Esta enzima no solo trabaja en el citoplasma donde funciona como una proteína clave en la ruta de la glucólisis, sino también en los plastidios, donde ejerce su propia glucólisis (Andriotis y col 2010). Estudios en A. thaliana han revelado que además puede ser encontrada en el núcleo donde funciona como un represor transcripcional de STZ/ZAT10, un represor de la ruta CBF/DREB1. En este sentido, enolasa puede funcionar indirectamente como un activador del regulón CBF, es decir, en la activación de la expresión de genes COR que incrementan la tolerancia al frío, por lo que esta enzima podría no solo tener un papel importante en el metabolismo de carbohidratos, sino también en la regulación de la inducción de la expresión de genes en respuesta al frío. Sin embargo, la enolasa localizada en el citoplasma con función glucolítica, es mucho más abundante que la enolasa localizada en el núcleo funcionando como regulador transcripcional (Kosová y col 2011).

La acumulación de enolasa fue mayor en los frutos sin TH (Figura 13, # 12), lo cual, al igual que lo sugerido con TPI, podría relacionarse con un aumento en la velocidad de respiración, posiblemente ocasionado por el metabolismo acelerado, uno de los síntomas del daño por frío en tomate (Morris 1982).

# e Subunidad II del complejo citocromo c reductasa/peptidasa de procesamiento mitocondrial

El complejo citocromo c reductasa mitocondrial (complejo bc1 o complejo III) es una enzima multisubunidad de la cadena respiratoria que cataliza la reducción de citocromo c por oxidación de ubiquinol. Acoplado a esta reacción, transporta protones de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal y de este modo, contribuye al gradiente quimiosmótico a través de la membrana interna (Brumme y col 1998). En plantas, se ha reportado que este complejo tiene actividad bifuncional, presentando además actividad de procesamiento hacia precursores de proteínas mitocondriales (Emmermann y col 1993), ya que dos de sus subunidades, proteínas centrales I y II, son idénticas a subunidades del complejo peptidasa de procesamiento mitocondrial (Glaser y Dessi 1999).

Las proteínas destinadas a compartimentos mitocondriales generalmente tienen secuencias señal en el extremo amino terminal, la cual las dirige al organelo y a la localización precisa intramitocondrial (Hartl y Neupert 1990). En la mayoría de los casos, estas secuencias son removidas durante el importe a la mitocondria debido, probablemente, a que podrían interferir con el plegamiento apropiado y ensamble o bien, con la función de la proteína (Emmermann y col 1993). La peptidasa de procesamiento mitocondrial que remueve estas señales forma parte del complejo citocromo c reductasa de la cadena respiratoria. Sin embargo, aun cuando la citocromo c reductasa y la peptidasa de procesamiento forman una entidad estructural muy compacta en la mitocondria de plantas, las subunidades que realizan

el procesamiento son funcionalmente independientes de las subunidades respiratorias (Emmermann y Schmitz 1993).

La acumulación de la subunidad II del complejo citocromo c reductasa/ peptidasa de procesamiento mitocondrial fue mayor en los tomates sin TH almacenados por 20 días a 5 °C (Figura 12, # 9), lo cual coincide con lo reportado por López-Espinoza (2008) quien al evaluar tejido de tomate variedad Imperial con severos síntomas de DF (tejido dañado) y tejido sano, encontró una mayor acumulación de esta proteína en el tejido dañado con rspecto al tejido sano. Este resultado podría conducir a un incremento en la actividad peptidasa de procesamiento en respuesta a la necesidad de un mayor importe de proteínas a la mitocondria para contrarrestar el estrés o bien, para reemplazar a las que han sido dañadas por la temperatura baja. Además, la acumulación del complejo II de la cadena respiratoria podría estar relacionada con el aumento en la velocidad de respiración, uno de los síntomas reconocidos en tejidos dañados por frío (Saltveit 2000).

#### 2 Proteínas relacionadas con respuesta al estrés y defensa

#### a Proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico (HSPs) son parte de un grupo de proteínas inducidas bajo condiciones de estrés para proteger al tejido del daño causado o para ayudar a repararlo (Leshem y Kuiper 1996). Como se esperaba, se observó una mayor acumulación de proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSPs) de 17.6 y 17.7 kDa en los frutos sometidos al TH con respecto a los no tratados, tanto al día 20 de almacenamiento en frío como después de la maduración a 21°C

durante 7 días (Figuras 12 y 14; # 8 y 5). Esto coincide con estudios previos donde se ha reportado que las tempertaruas altas moderadas inducen la síntesis de proteínas de bajo peso molecular en frutos de tomate (Sabehat y col 1996), las cuales podrían estar contribuyendo en la adquisición de la termotolerancia por parte de los frutos y podrían tener un papel específico en la adquisición de la tolerancia al DF. Zhang y col (2013) reportaron que la expresión y síntesis de las sHSPs podrían ser inducidas para prevenir la desnaturalización de las proteínas bajo condiciones adversas como el estrés oxidativo y que además poseen actividad antioxidante. Además, Süle y col (2004) sugieren que el acondicionamiento de los frutos a temperaturas altas incrementa la abundancia de las proteínas de bajo peso molecular.

En frutos de tomate, Page y col (2010) observaron la acumulación de dos HSPs, las cuales parecen estar relacionadas con tolerancia al frío; interesantemente, estas proteínas son de la familia de las HSP20 (HSP 17.4 y HSP 17.6), lo cual coincide con lo encontrado en el presente estudio. Esto confirma junto con otras investigaciones que la acumulación de esta familia de proteínas es clave como la primera respuesta del tomate para hacer frente al DF (Sánchez-Bel y col 2012).

También se observó una mayor acumulación de una proteína de choque térmico de alto peso molecular en frutos con TH después de 20 días de almacenamiento en frío y después de la maduración a 21°C por 7 días, la cual fue identificada como una HSP60 kDa (Figuras 12 y 14; # 3). En este sentido, se ha documentado que las sHSPs trabajan en asociación con otras HSPs que están particularmente implicadas en la agregación transitoria de las proteínas mal plegadas (Zhang y col 2013).

Por otro lado, una de las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (HSP de clase II de 17.6 kDa) presentó una disminución en su acumulación durante la maduración a 21°C de los frutos de tomate con y sin TH con respecto al día 20 de almacenamiento en frío, lo cual coincide con lo reportado por Rocco y col (2006). Reportes previos sugieren un papel central de las HSP en el desarrollo del fruto bajo condiciones fisiológicas, además de su efecto protector contra diferentes tipos de estrés (Sabehat y col 1998; Löw y col 2000; Neta-Sharir y col 2005; Rocco y col 2006). Sin embargo, en contraste con la gran cantidad de investigaciones sobre el rol de estas proteínas en la tolerancia a estrés, su papel en la maduración ha sido poco considerado. La elucidación del papel de las HSP en el desarrollo del fruto podría proveer una contribución significativa al entendimiento de los mecanismos moleculares que controlan el proceso de maduración (Neta-Sharir y col 2005).

## b Tioredoxin peroxidasa 1 (Tpx1)

Otra proteína identificada del análisis entre los frutos con TH y sin TH fue tioredoxin peroxidasa I (TPxI), la cual se acumuló mayormente en los frutos con TH (Figura 12, # 6). Las tioredoxin peroxidasas (TPxs) son miembros de la familia de enzimas antioxidantes peroxiredoxinas (PRx) y juegan un papel muy importante en el metabolismo del peróxido de hidrógeno (Nakamura y col 2005). TPx es la enzima inmediata que detoxifica el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Jin y col 1997) a través del sistema tioredoxina (Ross y col 2000). La detoxificación a través del sistema tioredoxina consiste en la neutralización del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la oxidación de TPx; la TPx resultante que contiene un enlace disulfuro es reducida por tioredoxina y posteriormente la tioredoxina oxidada

es reducida por NADPH o ferredoxina a través de la función catalítica de tioredoxin reductasa (Balmer y col 2003; Nakamura y col 2005).

TPxI contiene dos cisteínas involucradas en la catálisis, por lo que se clasifica como una 2-cis Prx (Demasi y col 2006). Baier y Dietz (1997) reportaron una 2-cis Prx cloroplástica en cebada formando parte del sistema de defensa antioxidante y protegiendo a la membrana fotosintética del daño oxidativo. En Arabidopsis thaliana, la supresión antisentido de una 2-cis Prx afectó la estructura y función de los cloroplastos, particularmente durante las etapas tempranas del desarrollo de las hojas (Baier y Dietz 1999). Por otra parte, Do y col (2003) reportaron la sobreexpresión de un gen para una TPx en chile (CAPOT1) en respuesta al tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que Sakamoto y col (2003) demostraron la habilidad de una TPx citósolica (TPxIc) de Arabidopsis para proteger contra el estrés inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NO.

La mayor expresión de TPxI encontrada en este trabajo en los frutos sometidos al TH sugiere que la acumulación de esta proteína es necesaria para proteger al tejido del posible estrés oxidativo provocado por la temperatura baja. Se ha encontrado que en *S. cerevisiae*, la TPxIc es una enzima bifuncional con roles protectores en la defensa celular contra el estrés oxidativo y térmico, exhibiendo actividades de peroxidasa y chaperona. Las condiciones oxidantes fuertes y/o las temperaturas altas inducen cambios importantes en la estructura cuaternaria de esta proteína conduciendo a la formación de complejos grandes con actividad de chaperona. El mecanismo involucrado en el cambio de actividad peroxidasa a chaperona podría estar relacionado con los procesos de homeostasis celular (De Oliveira y col 2007).

### c Superóxido dismutasa (SOD)

La enzima superóxido dismutasa forma parte del sistema enzimático antioxidante y cataliza la conversión de los radicales superóxido produciendo peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, por lo que esta enzima es clave para la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Gómez y col 2009). Es considerada de vital importancia para la supervivencia y función de los organismos aeróbicos ya que es la responsable de remover los radicales superóxido que se forman constantemente durante procesos como la respiración y fotosíntesis (Alsher y col 2002).

La acumulación de esta enzima fue notoriamente mayor en los frutos TH almacenados por 20 días a 5°C y madurados por 7 días a 21°C (Figura 14, # 15), los cuales presentaron menor incidencia de síntomas de DF. El aumento en la acumulación de esta enzima puede ser clave en la protección contra el estrés oxidativo y podría estar contribuyendo en la eliminación el exceso de EROs y con ello disminuir los daños que provocan en las membranas de los tejidos, induciéndole a los frutos tolerancia al DF. Por otra parte, los frutos sin TH almacenados a 5°C presentaron una mayor incidencia de síntomas de DF, lo cual podría relacionarse con una menor capacidad de contrarrestar EROs debido a la menor acumulación de SOD.

Cárdenas-Torres (2013) observó una mayor actividad de la enzima SOD en tomates cv. Imperial previamente sometidos a un TH y que fueron almacenados a temperatura de DF (5°C). Debido a que los frutos con TH presentaron mayor

tolerancia al DF, se sugirió que el aumento en la actividad de esta enzima es clave en la protección contra el estrés oxidativo y de esta forma se disminuyen los daños que dan a lugar a los síntomas visibles de DF.

Se ha reportado que la acumulación de enzimas antioxidantes se ve incrementada durante la maduración de frutos en respuesta a tratamientos térmicos (Paull y Chen 2000). Vicente y col (2006) reportaron que el TH causó cambios en el metabolismo oxidativo de fresas, observándose mayor actividad de SOD durante el almacenamiento. Zhang y col (2013) observaron que al almacenar tomates cv. Messina en condiciones de DF previamente sometidos a un tratamiento con aire calienten la actividad de SOD se incrementaba en el transcurso de los días de almacenamiento.

## d Lactoil-glutatión liasa

La enzima lactoil-glutatión liasa, también conocida como Glioxalasa I, es una enzima crítica implicada en la detoxificación del metilglioxal (MG). La función detoxificadora de esta enzima es crucial para la conversión del metilglioxal a su correspondiente derivado no tóxico D-lactato (Chakraborty y col 2015).

El metilglioxal es catabolizado por las enzimas glioxilasas I y II y por las enzimas de unión al zinc de la ruta glioxalasa. El sistema glioxalasa está presente en el citosol de las células y en los organelos celulares, particularmente en la mitocondria (Thornalley 1990).

La enzima lactoil-glutatión liasa ha sido relacionada con la respuesta de las plantas al estrés. En un estudio realizado por Yu y col (2015) en frutos de durazno

almacenados a 5°C, relacionaron una mayor acumulación de esta proteína como respuesta de los frutos a la exposición al frío. Por su parte, Rocco y col (2006) identificaron esta enzima en gran abundancia en dos eco tipos de tomate SM y AC durante la maduración de los mismos, resaltando el papel de esta enzima en la detoxificación del metilgioxial, un compuesto formado principalmente como un subproducto del metabolismo de los carbohidratos y de lípidos.

Esta enzima presentó una mayor acumulación en los frutos sin TH (Figura 14, #15). Debido a que esta enzima participa en la degradación del metilgioxal, el cual es un compuesto citotóxico formado principalmente como un subproducto del metabolismo de los lípidos y carbohidratos, la mayor acumulación de esta enzima en los frutos sin TH podría relacionarse con una mayor necesidad de detoxificación celular.

## 3 Proteínas relacionadas con patogénesis

#### a Remorina 1

Otra proteína identificada por MS/MS fue remorina 1. Las remorinas (REMs) forman una superfamilia de proteínas asociadas a balsas lipídicas (microdominios ricos en esfingolípidos y esteroles) en la membrana plasmática, son proteínas específicas de plantas cuya función y estructura es desconocida (Bariola y col 2004; Raffaele y col 2009). Sin embargo, basado en la estructura predicha de la proteína, se ha reportado que interactúa con otras macromoléculas (Reymond y col 1996) y se ha demostrado su habilidad para formar estructuras filamentosas oligoméricas, sugiriendo que podrían ser componentes estructurales del citoesqueleto v/o

esqueletos membranales (Bariola y col 2004). Además, se ha establecido su papel potencial en la actividad biológica de oligogalacturónidos (OGs), reportándose una interacción directa entre la proteína y OGs, probablemente a través de un mecanismo en el que OG causa un cambio conformacional en la proteína, conduciendo a su interacción con una proteína cinasa y consecuentemente, a la fosforilación. Debido a esto, la fosforilación de la proteína puede considerarse como un probable mecanismo regulatorio involucrado en la señalización por OGs (Reymond y col 1996). La mayor acumulación de remorina 1 observada en este trabajo durante la maduración a 21°C de los frutos con TH previamente almacenados a 5°C (Figura 14, # 2) podría deberse al posible papel de la proteína en la ruta de transducción de señales, a través de la cual los OGs provenientes de la depolimerización de la pared celular pueden estimular la maduración del fruto, que como se observó en el IDF estos frutos tuvieron una mejor maduración con respecto a los frutos sin tratar.

Por otra parte, datos actuales reportan que las remorinas restringen el movimiento viral en las hojas de tomate, y se ha demostrado la importancia de la simbiosis específica de las remorinas durante la infección bacteriana en raíces, lo que sugiere que estas proteínas pueden tener funciones regulatorias y estar relacionadas en la defensa de las plantas al estrés por patógenos (Jarsh y Ott 2011), por lo que la mayor acumulación de remorina 1 observada en este trabajo en los tejidos sometidos al TH durante el almacenamiento a 5°C (Figura 12, # 2), podría deberse al posible papel de la proteína en una ruta de transducción de señales utilizada por los tejidos para diferentes tipos de estreses. No obstante, también se ha

planteado que las remorinas podrían estar asociadas a los plasmodesmos y potencialmente estar involucradas en el transporte molecular (Reymond y col 1996).

### b Proteína relacionada con patogénesis 10

En las células vegetales, las proteínas relacionadas con patogénesis (pathogesisrelated protein, PR) trabajan en un rango amplio de procesos relacionados con transducción de señales y actividad antimicrobiana. Originalmente se pensaba que estas proteínas eran inducidas por diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, subsecuentemente se encontró que se expresaban constitutivamente en diferentes órganos de las plantas durante el crecimiento (Van Loon y col 2006).

Las PR se clasifican en 17 familias basadas en su función estructural y características funcionales. En la mayoría de las familias de PR, los mecanismos moleculares que describen su actividad en los procesos de defensa aún no son claros (Zubini y col 2009).

Entre las PR identificadas, la familia de las PR-10, es un grupo amplio de proteínas que contiene alrededor de 100 miembros y se encuentran ampliamente distribuídas en las plantas (Liu y col 2006). Las PR-10 son consideradas como una familia multifuncional asociadas con el almacemaniento y transporte de hormonas, espeficifamente citoquininas (Fernándes y col 2008), así como en un posible rol con actividad ARNasa, en el metabolismo de citoquininas y en la defensa de las plantas al estrés (Srivastava y col 2007).

Diversas PR-10 son acumuladas mayormente durante la infección de un patógeno (Walter y col 1990), sugiriendo que tienen un papel importante en los

mecanismos de defensa contra microbios y hongos y en la protección de las plantas contra el estrés abiótico (Yu y col 2000).

En el presente estudio, se observó una mayor expresión de esta proteína durante la maduración a 21°C de los frutos de tomate, previamente almacenados en frío (5°C), por otro lado, la acumulación de esta proteína se observó mayormente en los frutos con TH (Figura 14, # 13), lo cual podría sugerir la función de esta proteína en la inducción de la resistencia por parte de los frutos de tomate.

Ha sido observado que los genes PR son activados en situaciones de estrés por lo que las PR tienen una pequeña contribución en el estado protectivo de las plantas (Van Loon y col 2006).

#### 4 Proteínas relacionadas con metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos

### a Leucin-aminopeptidasa 2 cloroplástica

Las Leucino aminopeptidasas (LAP) constituyen un conjunto diverso de exopeptidasas que catalizan la hidrólisis de residuos de leucina de los enlaces amino-terminal de proteínas o péptidos (Rawlings y Barrett 2004). Estas enzimas tienen un rango variable de temperatura y pH óptimo, algunas poseen funciones distintivas, como factores transcripcionales, mediadoras de sitios específicos de recombinación o interaccionando con transportadores membranales clave (Matsui y col 1990). Se han descrito cDNAs codificantes para enzimas LAP en *Arabidopsis thaliana*, papa y tomate (Bartling y Weiler 1992; Hildmann y col 1992; Pautot y col 1993). Existen dos clases de LAP de 55 kDa en tomate que pueden distinguirse por sus puntos isoeléctricos (pl) y patrones diferenciales de expresión, las LAP-N, con pl

neutro y LAP-A, con pl ácido (Gu y col 1996). Las proteínas LAP-A se acumulan durante todo el desarrollo de los órganos florales, en tomate más específicamente en el ovario y tegumento, sugiriendo un rol nutrimental de las LAP-A para el desarrollo del embrión (Milligan y Gasser 1995; Ruoaz-Rivero y Prat 1998; Chao y col 1999), mientras que las LAP-N se acumulan en las hojas de tomate sanas (Gu y col 1996).

En plantas, los genes que codifican para las LAP incrementan en respuesta al déficit de agua, estrés salino, y en tomate, específicamente por el daño mecánico ocasionado por infección de *Pseudomonas syringae pv.* y por la plaga *Spodoptera littoralis* (Pautot y col 1993, Gu y col 1996, Chao y col 1999).

En este estudio, se observó una mayor expresión de LAP en los tejidos sin TH al día 20 de almacenamiento en frío, situación que prevaleción después de que estos frutos se maduraron por 7 días a 21°C (Figuras 12 y 14; # 11). Esto podría atribuirse a que los tejidos sin TH presentaron una mayor incidencia de síntomas y tejido dañado, por lo tanto, se necesita una mayor acumulación de estas enzimas en estos tejidos para contrarrestar el estrés ocasionado por el DF. Las isoformas de LAPs pueden estar facilitando el plegamiento de las proteínas que fueron dañadas mediante especies reactivas de oxígeno generadas durante el almacenamiento a temperaturas bajas (Bartling y Weiler 1992; Baek y Skinner 2003), alternativamente pueden hidrolizar proteínas para proporcionar amino ácidos que ayuden a soportar los cambios substanciales en la síntesis de proteínas asociadas con el estrés causado por las temperaturas bajas (Gu y Walling 2000).

#### b Nucleósido difosfato kinasa

Las nucleósido difosfato kinasas (NDPKs) son una clase de enzimas constitutivas. En general, su función principal es mantener los niveles intracelulares de los nucleósidos difosfatos (NTPs) requeridos en la biosíntesis con excepción del ATP. Diversos estudios señalan que las NDPKs son enzimas multifuncionales que participan en diversos procesos celulares vitales como la regulación, crecimiento y desarrollo de las plantas (Yano y col 1995), transducción de señales (Choi y col 1999), radiaciones UV (Zimmermann y col 1999), estrés térmico (Escovar-Galvis y col 2001) y estrés oxidativo mediado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Moon y col 2003).

D'Ambriosio y col (2013) en un análisis de proteómica durante la maduración de durazno encontraron que la NDPK mostraba una disminución progresiva durante la maduración de los frutos, tendencia similar a la encontrada en otros frutos (Rocco y col 2006; Huerta-Ocampo 2012), donde se señala la importancia de esta enzima en los procesos de señalización.

En el presente estudio se observó una mayor acumulación de esta enzima en los frutos maduros con TH (Figura 14, # 16), lo cual corresponde con el hecho de que las NDPKs además juegan un papel significativo en la tolerancia a varios tipos de estrés (Wang y col 2014).

# 5 Proteínas relacionadas con la regulación de la expresión génica

# a Proteína rica en glicina (GR-RBP)

Las proteínas de unión al ARN ricas en glicina (GR-BPs) poseen un motivo de reconocimiento al ARN (RRM) en el amino N-terminal y en la región C-terminal rica en glicina y están involucradas en la regulación del metabolismo y procesamiento del

ARNm (Kim y col 2010). Estas GR-RBPs se encuentran presentes en todas las plantas y su funcionalidad y efecto en la tolerancia al estrés y adaptación al frío, ha sido reportado en diversos estudios los cuales reflejan claramente que las GR-RBPs juegan un papel muy importante en la respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés. (Kwak y col 2005; Kim y col 2005; Kim y col 2007a; Kim y col 2007b; Kim y col 2010).

La acumulación diferencial de la proteína rica en glicina (GR-RBP) se observó al día 20 de almacenamiento en frío (Figura 12, # 7) y después de los 7 días de maduración, siendo mayor en los frutos con TH (Figura 14, # 7). Esta proteína se encontró previamente en mayor abundancia en tejido sano que en tejido dañado en tomate cv Imperial sometido a temperatura de DF sin TH previo (Vega-García y col 2010), lo cual corresponde con lo observado en el presente estudio ya que los frutos con TH presentaron una menor incidencia de síntomas.

Se ha observado que bajo condiciones normales las GR-RBPs podrían estar involucradas en el buen funcionamiento celular mientras que durante situaciones de estrés éstas pueden estar involucradas en la regulación, transporte, estabilidad y traducción del RNA (Ambrosone 2012).

Kim y col (2005) investigaron el papel biológico de una GR-RBP en Arabidopsis thaliana (atRZ-1a) bajo condiciones de estrés, encontrando que solo el estrés por frío incrementó la expresión del gen atRZ-1a. Los autores también proveen evidencia de que atRZ-1a ejerce tolerancia al frío o al congelamiento en plantas presentando actividad chaperona del ARN durante los procesos de aclimatación. Kim y col

(2007a) reportaron que el estrés por frío incrementó la expresión de GR-RBPs (GR-RBP2, 4 y 7), apoyando fuertemente la propuesta de que estas proteínas ejercen actividad chaperona del ARN durante el proceso de adaptación al frío. Kim y col (2007b) reportaron que GR-RBP2 ejerce su función en la tolerancia a la congelación en Arabidopsis mediante la modulación de la expresión y actividad de varias clases de genes. Además, GR-RBP2 fue capaz de desdoblar la estructura secundaria del ARN in vivo, confirmando su actividad chaperona del ARN.

Todos estos estudios sugieren que GR-RBP parece estar involucrada en la aclimatación o tolerancia del tejido a la temperatura baja mediante su actividad de chaperona del ARN modulando la transcripción y/o traducción de algunos genes bajo condiciones de estrés por frío, papel que se ha demostrado previamente para este tipo de proteínas (Kim y col 2010).

# E CONSIDERACIONES SOBRE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA TOLERANCIA AL DAÑO POR FRÍO

Los resultados del presente trabajo ubican al estrés oxidativo como uno de los principales eventos asociados al desarrollo de los síntomas del daño por frío (DF), por lo que la tolerancia a este desorden inducida por el tratamiento térmico se relaciona principalmente con mecanismos de control del estrés oxidativo y mantenimiento de la homeóstasis celular.

La exposición del tejido a una temperatura baja conduce a la modificación del metabolismo celular para ajustarse a las posibles consecuencias del estrés, resultando en un incremento de azúcares, principalmente hexosas, aminoácidos,

poliaminas e intermediarios del ciclo de Krebs, entre otros (Cook y col 2004; Guy y col 2008). Consistente con estos resultados, en el presente estudio se encontró una mayor acumulación en tejido sin TH de las enzimas triosa fosfato isomerasa y enolasa, enzimas importantes en el metabolismo central de hidratos de carbono, lo cual podría ser el resultado de una eficiencia celular baja en la producción de energía desencadenada por un daño estructural severo. Estas enzimas, en conjunto con la subunidad II del complejo citocromo c reductasa/peptidasa de procesamiento mitocondrial, lactoil-glutation-liasa y leucin-aminopeptidasa 2 cloroplástica, podrían trabajar en la detoxificación celular a temperatura baja.

Otro aspecto de la modificación de los procesos celulares en respuesta a la temperatura baja se relaciona con el desarrollo de mecanismos de tolerancia al estrés. El tratamiento hidrotérmico de los frutos resultó en una mayor acumulación de proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSPs), las cuales podrían ser inducidas para prevenir la desnaturalización de las proteínas bajo condiciones de estrés, por lo que se ha sido considerado como la primera respuesta del tomate para hacer frente al DF (Sabehat y col 1996; Sánchez-Bel y col 2012).

Las enzimas antioxidantes tioredoxina peroxidasa y superóxido dismutasa, las cuales participan en la detoxificación de peróxido de hidrógeno y radicales superóxido, también presentaron mayor acumulación en frutos con TH con respecto a los no tratados. El aumento en la acumulación de estas enzimas puede ser clave en la protección contra el estrés oxidativo y podría estar contribuyendo en la eliminación el exceso de EROs y con ello disminuir los daños que provocan en las membranas de los tejidos, induciéndole a los frutos tolerancia al DF.

La proteína rica en glicina que se une al ARN (GR-RBP), la cual presentó una mayor acumulación en tejido sano, podría jugar un papel en la aclimatación al frío mediante su actividad de chaperona del ARN, modulando la transcripción y/o traducción de algunos genes bajo condiciones de estrés por frío.

Se requieren estudios adicionales para profundizar en el entendimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la tolerancia al daño por frío. Por ejemplo, determinar la actividad de las enzimas identificadas y otras por identificar ya que esta podría no relacionarse adecuadamente con su abundancia. Además, el incluir un análisis de metabolitos permitiría conocer de mejor manera las modificaciones del metabolismo celular en respuesta al TH y la tolerancia al DF inducida por este tratamiento térmico.

#### VIII CONCLUSIONES

- Los resultados sugieren que el TH no afecta la calidad de los frutos de tomate y su aplicación resulta benéfica ya que contribuye en la disminución de los síntomas visibles del DF.
- La efectividad del TH para inducir tolerancia al DF en frutos de tomate se evidenció en una menor fuga de electrolitos y menor peroxidación de lípidos en los frutos.
- La separación bidimensional de proteínas permitió detectar alrededor de 300 polipéptidos en cada una de las muestras, de los cuales aproximadamente el 4% estuvieron relacionados con la tolerancia al DF.
- El estrés por frío indujo una mayor expresión de las enzimas TPI (triosa fosfato isomerasa) y enolasa en frutos sin TH, lo cual podría ser el resultado de una eficiencia celular baja en la producción de energía debida a la temperatura baja.
- Algunas de las proteínas que presentaron una mayor acumulación en frutos sin TH y con mayor incidencia de síntomas fueron la subunidad II del complejo citocromo c reductasa/peptidasa de procesamiento mitocondrial, lactoilglutation-liasa y una leucin-aminopeptidasa 2 cloroplástica, las cuales podrían trabajar conjuntamente en la detoxificación celular a baja temperatura.
- Se observó una mayor acumulación de proteínas de choque térmico en frutos con TH, las cuales podrían estar contribuyendo en la adquisición de termotolerancia y podrían tener un papel específico en la adquisición de tolerancia al DF.

 La acumulación de una tioredoxina peroxidasa, superóxido dismutasa y una proteína rica en glicina que se une al ARN fue mayor en frutos con TH y menor incidencia de síntomas, lo que sugiere un papel importante de estas enzimas en la tolerancia del tejido al frío, probablemente a través de la eliminación de radicales libres y la regulación de la expresión de genes a baja temperatura.

#### IX BIBLIOGRAFÍA

- Aghdam MS, Asghari M, Khorsandi O, Mohayeji M. 2012. Alleviation of postharvest chilling injury of tomato fruit by salicylic acid treatment. Journal of Food Science and Technology 5(10):2815-2820.
- Aghdam MS, Sevillano L, Flores FB, Bodbodak S. 2013. Heat shock proteins as biochemical markers for postharvest chilling stress in fruits and vegetables. Scientia Horticulturae 160:54-64.
- Ahsan N, Lee DG, Lee SH, Kang KY, Bahk JD. Choi MS, Lee IJ, Renaut J, Lee BH. 2007. A comparative proteomic analysis of tomato leaves in response to waterlogging stress. Plant Physiology 131:555-570.
- Akbudak B, Akbudak N, Sniz V, Eris A. 2007. Sequential treatments of hot water and modified atmosphere packaging in cherry tomatoes. Journal of Food Quality 30:869-910.
- Alba R, Fei Z, Payton P, Liu Y, Moore SL, Debbie P, Gordon JS, Rose JKC, Martin G, Tanksley SD, Bouzayen M, Jahn MM, Giovannoni J. 2004. ESTs, Cdna Microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. The Plant Journal 39(5):697-714.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany 53:1331-1341.
- Amme S, Matros A, Schlesier B, Mock HP. 2006. Proteome analysis of cold stress response in Arabidopsis thaliana using DIGE-technology. Journal of Experimental Botany 57:1537-46.
- Ambrosone A, Costa A, Leone A, Grillo S. 2012. Beyond transcription: RNA-binding proteins as emerging regulators of plant response to environmental constraints. Plant Science 182:12-82.

- Andersson I y Taylor TC. 2003. Structural framework for catalysis and regulation in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Archives of Biochemistry and Biophysics 414: 130-140.
- Anderson JV, Li QB, Haskell DW y Guy CL. 1994. Structural organization of the spinach endoplastic reticulum-luminal 70-kilodalton heat shock cognate gene and expression of 70-heat shock genes during cold acclimation. Plant Physiology 104: 1359-1370.
- Andriotis VME, Kruger NJ, Pike MJ, Smith AM. 2010. Plastidial glycolysis in developing Arabidopsis embryos. New Phytologist 185:649-62
- Bae MS, Cho EJ, Choi EY, Park OK. 2003. Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. The Plant Journal 36:652-663.
- Baek KH, Skinner DZ. 2003. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. Plant Science 165:1221–7.
- Baier M, Dietz KJ. 1997. The Plant 2-Cys Peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded choloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. The Plant Journal 12:179-190.
- Baier M, Dietz KJ. 1999. Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic Arabidopsis. Plant Physiology 119: 1407-1414.
- Balmer Y, Koller A, del Val G, Marieri W, Schürmann P y Buchanan BB. 2003. Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. Proceeding of the National Academy of Sciences 100(1):370-375.
- Bariola PA, Retelska D, Stasiak A, Kammerer RA, Fleming A, Hijri M, Frank S, Farmer EE. 2004. Remorins form a novel family of coiled coil-forming oligomeric and filamentous proteins associated with apical, vascular and embryonic tissues in plants. Plant Molecular Biology 55:579-594.

- Bartling D, Weiler EW. 1992. Leucine aminopeptidase from Arabidopsis thaliana. Molecular evidence for a phylogenetically conserved enzyme of protein-turnover in higher plants. European Journal of Biochemistry 205:425-431.
- Bergougnoux V. 2013. The history of tomato: from domestication to biopharming. Biotechnology Advances 32:170-189.
- Blanca J, Cañizares J, Cordera L, Pascual L, Diez MJ, Nuez F. 2012. Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. PloS One 7(10):e48198.
- Bohnert HJ, Jensen RG. 1996. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. Trends in Biotechnology 14:89-97.
- Bombarely A, Menda N, Tecle IY, Buels RM, Strickler S, Fischer-York T. 2011. The Sol Genomics Network (solgenomics.net): growing tomatoes using Perl. Nucleic Acids Research 39:D1149-D1155.
- Boston RS, Viitanen PV, Vierling E. 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. Plant Molecular Biology 32:191-222.
- Brumme S, Kruft V, Schmitz UK, Braun HP. 1998. New insights into the co-evolution of cytochrome c reductase and the mitochondrial processing peptidase. Journal of Biological Chemistry 273(21):13143-13149.
- Cánovas FM, Dumas-Gaudot E, Recorbet G, Jorrin J, Mock HP, Rossignol M. 2004. Plant Proteome Analysis Proteomics 4:285-298.
- Cárdenas-Torres F. 2013. Cambios fisiológicos y de actividad de enzimas del sistema antioxidante en frutos de tomate con tolerancia inducida al daño por frío. [Tesis de Maestría]. Culiacán, México: Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. 142 p.
- Cayir E, Erdemir A, Ozkan E, Topuzogullari M, Bolat ZB, Akat A. 2014. Cloning of intron-removed enolase gene and expression, purification, kinetic characterization of the enzyme from Theileria annulata. Molecular Biotechnology 56:689-696.

- Chakraborty S, Gogoi M, Chakravortty D. 2015. Lactoylglutathione lyase, a critical enzyme in methylglyoxal detoxification, contributes to survival of Salmonella in the nutrient rich environment. Virulence 6(1):50-65.
- Chao WS, Gu YQ, Pautot V, Bray EA, Walling LL. 1999. Leucine aminopeptidase RNAs, proteins and activities increase in response to water deficit, salinity and the wound signals-systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid. Plant Physiology 120(4):979-992.
- Cheng L, Gao X, Li S, Shi M, Javeed H, Jing X. 2010. Proteomic analysis of soybean [*Glycine max* (L.) Meer.] seeds during imbibition at chilling temperature. Molecular Breeding 26:1-17.
- Cho MR, Lee KH, Hyun YB, Lee I y Kim HJ. 2007. Proteome analysis of vernalization-treated *Arabidopsis thaliana* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Bulletin of the Korean Chemical Society 28(3):427-431.
- Choi G, Yi H, Lee J, Kwon YK, Soh MS, Shin B, Luka Z, Hanh TR, Song PS. 1999. Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. Nature 401:610-613.
- Collins JK, Perkins-Veazie P, Roberts W. 2006. Lycopene: from plants to humans. HortScience 41:1135-1144.
- Cook D, Fowler S, Fiehn O, Thomashow MF. 2004. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(42):15243-15248.
- Couée I, Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A. 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany 57:449-459.
- Cox J, Mann M. 2007. Is proteomics the new genomics? Cell 130:395-398.

- Craig EA, Weissman JS, Horwich AL. 1994. Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. Cell 78:365-372.
- Crisosto CH, Garner D, Crisosto G. 2002. High carbon dioxide atmosphere affect stored 'Thompson Seedless' table grape. HortScience 37:1074-1078.
- Cruz-Mendívil A, López-Valenzuela JA, Calderón-Vázquez L, Vega-García MO, Reyes-Moreno C, Valdez-Ortiz A. 2015. Transcriptional changes associated with chilling tolerance and susceptibility in Micro-Tom tomato fruit using RNA-seq. Posharvest Biology and Technology 99:141-151.
- D'Ambrosio C, Arena S, Rocco M, Verrillo F, Novi G, Viscosi V, Marra M, Scaloni A. 2013. Proteomic analysis of apricot fruit during ripening. Journal of Proteomics 78:39-57.
- Dai N, German MA, Matsevitz T, Hanael R, Swartzberg D, Yeselson Y, Petreikov M, Schaffer AA, Granot D. 2002. LeFRK2, the gene encoding the major fructokinase in tomato fruits, is not required for starch biosynthesis in developing fruits. Plant Science 162:423-430.
- De Oliveira MA, Genu V, Discola KF, Alves SV, Netto LES, Guimaraes BG. 2007. Crystallization and preliminary x-ray analysis of a decameric form of cytosolic thioredoxin peroxidase 1 (Tsa1), C47S mutant, from Saccharomyces cerevisiae. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications F63:665-668.
- Demasi APD, Pereira GAG, Netto LES. 2006. Yeast oxidative stress response. influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. The Federation of European Biochemical Societies Journal 273:805-816.
- Ding CK, Wang CY, Gross KC, Smith DL. 2001. Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. Plant Science 161:1153-1159.

- Ding CK, Wang CY, Gross KC, Smith DL. 2002. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. Planta 214:895-901.
- Do HM, Hong JK, Jung HW, Kim SH, Ham JH, Hwang BK. 2003. Expression of peroxidase-like genes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annum*. Molecular Plant Microbe Interactions 16(3):196-205.
- Ellis RJ, van der Vies SM. 1991. Molecular chaperones. Annual Review of Biochemistry 60:321-347.
- Emmermann M, Schmitz UK. 1993. The cytochrome c reductase integrated processing peptidase from potato mitochondria belongs to a new class of metalloendoproteases. Plant Physiology 103:615-620.
- Emmermann M, Braun HP, Arretz M, Schmitz UK. 1993. Characterization of the bifunctional cytochrome c reductase-processing peptidase complex from potato mitochondria. Journal of Biological Chemistry 268(25):18936-18942.
- Escovar-Galvis ML, Marttila S, Hakansson G, Forsberg J, Knorpp C. 2001. Heat stress response in pea involves interaction of mitochondrial nucleoside diphosphate kinase with a novel 86-kilodalton protein. Plant Physiology 126:69-77.
- Fallik E. 2004. Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). Postharvest Biology and Technology 32:125-134.
- FAOSTAT 2016. Food and Agriculture Organization. Statistical Database. Disponible en: http://faostat.fao.org (Consultado el 18 de enero de 2016).
- Faurobert M, Mihr C, Bertin N, Pawlowski T, Negroni L, Sommerer N, Causse M. 2007. Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. Plant Physiology 143:1327-1346.
- Fernándes H, Pasternak O, Bujacz G, Bujacz A, Sikorski MM, Jaskolski M. 2008. Lupinus luteus pathogenesis-related protein as a reservoir for cytokinin. Journal of Molecular Biology 378:1040-1051

- Fernández-Ruíz V, Sánchez-Mata MC, Cámara M, Torija ME, Chaya C, Galiana-Balaguer L, Rosello S, Nuez F. 2004. Internal quality characterization of fresh tomato fruits. HortScience 39(2):339-45.
- Ferreira RB, Esquivel MG, Teixeira AR. 2000. Catabolism of ribulose bisphosphate carboxylase from higher plants. Current Topics in Phytochemistry 3:129-165.
- Foolad MR. 2007. Review: Genome mapping and molecular breeding of tomato. International Journal of Plant Genomics 7:195-238.
- Frenkel C, Jen JJ. 1989. Tomatoes. En: Michael NAE, editor. Quality preservation of vegetables. Boca Ratón, FL. CRC Press, Inc. p 53-74.
- Ghasemnezhad M, Marshak K, Shilton R, Babalar M, Woolf A. 2008. Effect of hot water treatments on chilling injury and heat damage in 'satsuma' mandarins: Antioxidant enzymes and vacuolar ATPase, and pyrophospatase. Postharvest Biology and Technology 48:364-371.
- Gil García C. 2003. La metodología proteómica, una herramienta para la búsqueda de función. Actualidad 35:12.
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W. 1993. Fruits: a developmental perspective. The Plant Cell 5:1439-1451.
- Glaser E, Dessi P. 1999. Integration of the mitochondrial-processing peptidase into the cytochrome bc1 complex in plants. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 31:259-274.
- Gómez P, Ferrer MA, Fernández-Trujillo JP, Calderón A, Artés F, Egea-Cortines M, Weiss J. 2009. Structural changes, chemical composition and antioxidant activity of cherry tomato fruits (cv. Micro-Tom) stored under optimal and chilling conditions. Journal of the Science of Food and Agriculture 89:1543-1551.
- Gong Z, Lee H, Xiong L, Jagendorf A, Stevenson B, Zhu JK. 2002. RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. Proceedings of the National Academy of Sciences 99(17):11507-11512.

- González-Aguilar GA, Tiznado-Hernández ME, Zavaleta-Gatica R, Martínez-Téllez MA. 2004. Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits. Biochemical and Biophysical Research Communications 313:694-701.
- Good DM, Coon JJ. 2006. Advancing proteomics with ion/ion chemistry. Biotechniques 40(6):783-789.
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics 4:3665-3685.
- Graumman P, Schroder K, Schmid R, Marahiel MA. 1996. Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 178(15):4611-4619
- Grierson D, Kader AA. 1986. Fruit ripening and quality. En Atherton, JC, Rudich J, editores. The tomato crop. A scientific basis for improvement. New York: Chapman and Hall Ltd. p 241-80.
- Griffith M, Yaish MWF. 2004. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. Trends in Plant Science 9:399-405.
- Gu YQ, Walling LL. 2000. Specificity of the wound-induced leucine aminopeptidase (LAP-A) of tomato. Activity of dipeptide and tripeptide substrates. European Journal of Biochemistry 267:1178–87.
- Gu YQ, Pautot V, Holzer FM, Walling LL. 1996. A complex array of proteins related to the multimeric leucine Aminopeptidase of tomato. Plant Physiology 110(4):1257-1266.
- Guy C. 1999. The influences of temperature extremes on gene expression, genomic structure, and the evolution of induced tolerance in plants. En Lerner HR Plant responses to environmental stresses: from phytohormones to genome reorganization. Boca Ratón, FL: CRC Press. p 497-548.
- Hanson PM, Yang R, Wu J, Chen J, Ledesma D, Tsou SC. 2004. Variation for antioxidant activity and antioxidants in tomato. Journal of the American Society for Horticultural Science 129:704-711.

- Hartl FU, Neupert W. 1990. Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. Science 247: 930-938.
- Haslbeck M. 2002. sHSPs and their role in the chaperone network. Cellular and Molecular Life Sciences 59:1649-1657.
- Henríquez C, González R, Krarup C. 2005. Tratamientos térmicos y progresión del daño por enfriamiento y de la pigmentación de tomates en postcosecha. Ciencia e Investigación Agraria 32(2):113-123.
- Hernández ML, Padilla MN, Sicardo MD, Mancha M, Martínez-Rivas JM. 2001. Effect of different environmental stresses on the expression of oleate desaturase genes and fatty acid composition in olive fruit. Phytochemistry 72:178-187.
- Hildmann T, Ebneth M, Pena-Cortes H, Sanchez-Serrano JJ, Willmitzer L, Prat S. 1992. General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. Plant Cell. 4(9):1157-1170. Jarsh y Ott 2011.
- Hobson GE, Grierson D. 1993. Tomato. En: Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA, editors. Biochemistry of Fruit Ripening. London, England: Chapman y Hall. p. 405-442.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta 207:604-611.
- Hodges DM, Lester GE, Munro KD, Toivonen PMA. 2004. Oxidative stress: importance for postharvest quality. HortScience 39:924-929.
- Hoffmann-Sommergruber K. 2000. Plant allergens and pathogenesis-related proteins. What do they have in common? International Archives of Allergy and Immunology 122:155-166.
- Horvath DP, Olson PA. 1998. Cloning and characterization of cold-regulated glycinerich RNA-binding protein genes from leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) and comparison to heterologous genomic clones. Plant Molecular Biology 38:531-538.

- Huerta-Ocampo JÁ, Osuna-Castro JA, Lino-López GJ, Barrera-Pacheco A, Mendoza-Hernández G, De León-Rodríguez. 2012. Proteomic analysis of differentially accumulated proteins during ripening and in response to 1-MCP in papaya fruit. Journal of Proteomics 75:2160-2169.
- Humphery-Smith I, Cordwell SJ, Blackstock WP. 1997. Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. Electrophoresis 18:1217-1242.
- Hurry VM, Strand A, Tobiaeson M, Gardeström P, Öquist G. 1995. Cold hardening of spring and winter wheat and rape results in differential effects on growth, carbon metabolism, and carbohydrate content. Plant Physiology 109:697-706.
- Ismail MA, Brown GE. 1979. Postharvest wound healing in citrus fruit: induction of phenylalanine ammonia-lyase in injured 'Valencia' orange flavedo. Journal of the American Society for Horticultural Science 104:126-129.
- Iwahashi Y, Hosoda H. 2000. Effect of heat stress on tomato fruit protein expression. Electrophoresis 21:1766-1771.
- Jacob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J. 1993. Small heat shock proteins are molecular chaperones. Journal of Biological Chemistry 268:1517-1520.
- Jarsch IK, Ott T. 2011. Perspectives on remorin proteins, membrane rafts, and their role during plant-microbe interactions. Molecular Plant Microbe Interactions 24(1):7-12
- Jin DY, Chae HZ, Rhee SG, Jeang KT. 1997. Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-κB activation. Journal of Biological Chemistry 272(49):30952-30961.
- Jones JB. 1999. Tomato plant culture: in the field, greenhouse and home garden. Boca Raton, FL: CRC Press. 199 p.

- Kerdnaimongkol K, Woodson WR. 1999. Inhibition of catalase by antisense RNA increases susceptibility to oxidative stress and chilling injury in transgenic tomato plants. Journal of the American Society for Horticultural Science 124:330-336.
- Kevany BM, Tieman DM, Taylor MG, Dal Cin V, Klee HJ. 2007. Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. The Plant Journal 51:458-46.
- Kim JS, Park SJ, Kwak KJ, Kim YO, Kim JY, Song J, Jang B, Jung CH, Kang H. 2007a. Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Research 35(2):506-516.
- Kim JY, Kim WY, Kwak KJ, Oh SH, Han YS, Kang H. 2010b. Glycine-rich RNA-binding proteins are functionally conserved in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* during cold adaptation process. Journal of Experimental Botany 61:231-2325.
- Kim JY, Park SJ, Jang B, Jung CH, Ahn SJ, Goh CH, Cho K, Han O, Kang H. 2007b. Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. The Plant Journal 50:439-451.
- Kim WY, Kim JY, Jung HJ, Oh SH, Han YS, Kang H. 2010a. Comparative analysis of *Arabidopsis* zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding proteins during cold adaptation. Plant Physiology and Biochemistry 48:866-872.
- Kim YO, Kim JS Kang H. 2005. Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 42:890-900.
- Kluge M, Schomburg M. 1996. The tonoplast as a target of temperature effects in crassulacean acid metabolism. En: Winter K y Smith JAC, editores. Crassulacean acid metabolism: biochemistry, ecophysiology and evolution. Berlin: Springer-Verlag. p 72-77.
- Köcher T, Superti-Furga G. 2007. Mass spectrometry-based functional proteomics: from molecular machines to proteins networks. Nature Methods 4(10):807-815.

- Kocsy G, Galiba G, Brunold C. 2001. Role of glutathione in adaptation and signaling during chilling and cold acclimation in plants. Physiologia Plantarum 113:158-164.
- Kosová K, Vitámvás P, Prásil IT, Renaut J. 2011. Plant proteome changes under abiotic stress-contribution of proteomics studies to understand plant stress response. Journal of Proteomics 74:1301-1322.
- Kwak KJ, Kim YO, Kang H. 2005. Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. Journal of Experimental Botany 56:3007-3016.
- Lane CS. 2005. Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. Cellular and Molecular Life Sciences 62:848869.
- Lee GJ, Pokala N, Vierling E. 1995. Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. Journal of Biological Chemistry 270:10432-10438.
- Lelievre JM, Latche A, Jones B, Bouzayen M, Pech JC. 1997. Ethylene and fruit ripening. Plant Physiology 101:727–39.
- Leshem Y, Kuiper P. 1996. Is there a GAS (General Adaption Syndrome) responses to various types of environmental stress? Biologia Plantarum 38:1-18.
- Liebler DC. 2002. Introduction to proteomics: tools for the new biology. Totowa, NJ: Human Press, Inc. 198 p.
- Liu JJ, Ekramoddoullah AKM. 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. Physiological and Molecular Plant Pathology 68:3-13.
- Liu YH, Offler CE, Ruan YL. 2013. Regulation of fruit and seed response to heat and drought by sugars as nutrients and signals. Frontiers in Plant Science 4:282.
- López-Camelo AF, Gómez P. 2004. Comparison of color indexes for tomato ripening. Horticultura Brasileira 22(3):534-537.
- López-Espinoza G. 2008. Evaluación de la calidad poscosecha e identificación de proteínas expresadas diferencialmente en frutos de tomate (*Lycopersicon*

- esculentum Mill) almacenados bajo condiciones de estrés por frío. [Tesis de Maestría]. Culiacán, México: Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. 152 p.
- López-Valenzuela JA, Valverde-Juárez FJ, Mejía-Torres SL, López-Angulo G, Vega-García MO. 2011. Effect of controlled atmosphere storage on the postharvest and nutritional quality of tomato fruit. Revista Chapingo 17(2):115-128.
- Los DA, Murata N. 1998. Structure and expression of fatty acid desaturases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Lipids and Lipid Metabolism 1:3-15.
- Löw D, Brändle K, Nover L, Forreiter C. 2000. Cytosolic heat-stress proteins Hsp 17.7 class I and 17.3 class II of Tomato act as molecular chaperones in vivo. Planta 211:575-582.
- Luengwilai K, Beckles DM, Saltveit ME. 2012. Chilling-injury of harvested tomato (Solanum lycopersicum L.) cv. Micro-Tom fruit is reduced by temperature pretreatments. Postharvest Biology and Technology 63:123-128.
- Lurie S, Sabehat A. 1997. Prestorage temperature manipulations to reduce chilling injury in tomatoes. Postharvest Biology and Technology 1:57-62.
- Lurie S, Laamin M, Lapsker, Fallik E. 1997. Heat treatments to decrease chilling injury in tomato fruit. Effects on lipids, pericarp lesions and fungal growth. Physiology Plantarum 100:297-302.
- Lurie S. 1998. Postharvest heat treatments. Posharvest Biology and Technology 14:257-269.
- Lyons JM. 1973. Chilling injury in plants. Annual Review of Plant Physiology 24:445-466.
- Ma Q, Suo J, Huber DJ, Dong X, Han Y, Zhang Z, Rao J. 2014. Effect of hot water treatments on chilling injury and expression of a new C-repeat binding factor (CBF) in 'Hongyang' kiwifruit during low temperature storage. Postharvest Biology and Technology 97:102-110.

- Madhavi DL, Salunkhe DH. 1998. Tomato. En: Salunkhe DK, Kadam SS, editores. Handbook of vegetable science and technology: production, composition, storage and processing. New York: Marcel Dekker, Inc. p 171-201.
- Majumdar S, Ghosh S, Glick BR, Dumbroff EB. 1991. Activities of chlorophyllase, phosphoenolpyruvate carboxilase and ribulose-1,5-bisphoshate carboxylase in the primary leaves of soybean during senescence and drought. Physiologia Plantarum 81:473-480.
- Malacrida C, Valle EM, Boggio SB. 2006. Postharvest chilling induces oxidative stress response in the dwarf tomato cultivar Micro-Tom. Physiologia Plantarum 127:10-18.
- Marangoni AG, Jackman RL, Stanley DW. 1995. Chilling associated softening of tomato fruit is related to increased pectin methyl esterase activity. Journal of Food Science 60(6):1277-1281.
- Manna A, Mimouni H, Wasti S, Gharbi E, Aschi-Smiti S, Faurobert M, Ahmed HB. 2013. Comparative proteomic analysis of tomato (*Solanum lycopersicum*) leaves under salinity stress. Plant Omics Journal 6(4):268-277.
- Matsui M, Fowler JH, Walling LL. 1990. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. Journal of Biological Chemistry 387:1536-1544.
- McDonald RE, McCollum TG, Baldwin EA. 1999. Temperature of water heat treatments influences tomato fruit quality following low-temperature storage. Postharvest Biology and Technology 16:147-155.
- McGlasson B. 2003. Tomatoes. En: Caballero B, Trugo LC, Fingls PM, editores. Encyclopedia of Food Science and Nutrition. New York: Academic Press, p 5800-5808.
- Miernyk JA. 1990. Glycolysis, the oxidative pentose phosphate pathway and anaerobic respiration. En Dennis DT y Turpin DH eds. Plant physiology, biochemistry and molecular biology. Harlow UK: Longman Scientific & Technical. p 77-100.

- Miller SS, Driscoll BT, Gregerson RG, Gantt JS, Vance CP. 1998. Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH. The Plant Journal 15:173-184.
- Milligan SB, Gasser CS. 1995. Nature and regulation of pistil expressed genes in tomato. Plant Molecular Biology 28:691-711
- Molina A, Mena M, Carbonero P, García-Olmedo F. 1997. Differential expression of pathogen-responsive genes encoding two types of glycine-rich proteins in barley. Plant Molecular Biology 33:803-810.
- Moon H, Lee B, Choi G, Shin D, Prasad DT, Lee O, Kwak SS, Kim DH, Nam J, Bahk J, Hong JC, Lee SY, Cho MJ, Lim CO, Yun DJ. 2003. NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100:358-363.
- Morris LL. 1982. Chilling injury of horticultural crop: an overview. HortScience 17:161-162.
- Muneer S, Jeon BR. 2015. Proteomic analysis of salt-stress responsive proteins in roots of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants towards silicon efficiency. Plant Growth Regulation 77:133-146.
- Nakamura T, Matsumura H, Inoue T, Kai Y, Uegaki K, Hagihara Y, Ataka M e Ishikawa K. 2005. Crystallization and preliminary x-ray diffraction analysis of thioredoxin peroxidase from the aerobic hyperthermophilic Archaeon Aeropyrum pernix K1. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications F61:323-325.
- Nakazato T, Housworth EA. 2011. Spatial genetics of wild tomato species reveals roles of the Andean geography on demographic history. American Journal of Botany 98:88-98.
- Nautiyal PC, Shono M. 2010. Analysis of the role of mitochondrial and endoplasmic reticulum localized small heat shock proteins in tomato. Biologia Plantarum 54:715-719.

- Neta-Sharir I, Isaacson T, Lurie S, Weiss D. 2005. Dual role for tomato heat shock protein 21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. Plant Cell 17: 1829-1838.
- Nishida I, Murata N. 1996. Chilling sensitivy in plants and cyanobacteria. The crucial contribution of membrane lipids. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47:541-568.
- Nishiyama I, Yamashita Y, Yamanaka M, Shimohashi A, Fukuda T, Oota T. 2004. Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other *Actinidia* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52:5472-5475.
- Orr GR, Raison JK. 1990. The effect of changing the composition of phosphatidyl glycerol from thylakoid polar lipids of oleander and cucumber on the temperature of the transition related to chilling injury. Planta 181:137-143.
- Orvar BL, Sangwan V, Omann F, Dhindsa RS. 2000. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. The Plant Journal 23:785-794.
- Page D, Gouble B, Valot B, Bouchet JP, Callot C, Kretzschmar A. 2010. Protective proteins are differentially expressed in tomato genotypes differing for their tolerance to low-temperature storage. Planta 232:483-500.
- Palma JM, Corpas FJ, Del Río LA. 2011. Proteomics as an approach to the understanding of the molecular physiology of fruit development and ripening. Journal of Proteomics 74:1230-1243.
- Park EJ, Jeknic Z, Sakamoto A, DeNoma J, Yuwansiri R, Murata N, Chen THH. 2004. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants and flowers from chilling damage. The Plant Journal 40:474-487
- Parry MAJ, Andralojc PJ, Khan S, Lea PJ, Keys AJ. 2002. Rubisco activity: effects of drought stress. Annals of Botany 89: 833-839.
- Paull RE. 1990. Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. En: Wang CY, editores. Chilling injury of horticultural crops. Boca Raton, FL. CRC Press, Inc. p 17-36.

- Paull RE, Chen NJ. Heat treatment and fruit ripening. 2000. Postharvest Biology and Technology 21:21-37.
- Pautot V, Holzer FM, Reisch B, Walling LL. 1993. Leucine aminopeptidase: an inducible component of defense response in *Lycopersicon esculentum* (tomato). Proceedings of the National Academy of Sciences. 90(21):9906-9910.
- Peralta IE, Spooner DM. 2007. History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). En: Razdan MK, Matto AK, editores. Genetic improvement of solanaceous crops, Vol. 2. Tomato, Enfield, NH: Science Publishers. p 1-27
- Peralta IE, Spooner DM. 2005. Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*Solanum* L. Section *Lycopersicon*). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 104:227–57.
- Petit-Jiménez D, Bringas-Taddei E, González-León A, García-Robles JM, Báez-Sañudo R. 2009. Effect of hydrothermal treatment on the ultrastructure of cuticle of mango fruit. UDO Agrícola 9(1):96-102.
- Pimentel E. 1994. Handbook of growth factors. Volume I: General basic aspects. Boca Raton, FL: CRC Press. 370 p.
- Powers SK, Locke M, Demirel HA. 2001. Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. Medicine & Science in Sports & Exercise 33: 386-392.
- Raffaele S, Bayer E, Lafarge D, Cluzet S, German Retana S, Boubekeur T, Leborgne-Castel N, Carde JP, Lherminier J, Noirot E, Satiat-Jeunemaître B, Laroche-Traineau J, Moreau P, Ott T, Maule AJ, Reymond P, Simon-Plas F, Farmer EE, Bessoule JJ, Mongrand S. 2009. Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. The Plant Cell 21(5):1541-55.
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP. 1995. Differential response of photosynthetic pigments, rubisco activity and rubisco protein of *Arabidopsis thaliana* exposed to UVB and ozone. Photochemistry Photobiology 62(4):727-735.

- Rawlings ND, Barrett AJ. 2004. Introduction: metallopeptidases and their clans. En: Rawlings ND y Salvesen G, editors. Handbook of Proteolytic Enzymes. 2da ed. New York: Academic Press, p 231-263.
- Reiland S, Messerli G, Baerenfaller K, Gerrits B, Endler A, Grossmann J. 2009. Large-scale Arabidopsis phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks. Plant Physiology 150:889-903.
- Renaut J, Hausman JF, Wisniewski ME. 2006. Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism. Physiologia Plantarum 126:97-109.
- Renaut J, Hoffmann L, Hausman JF. 2005. Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing tolerance in poplar plantlets. Physiologia Plantarum 125 82-94.
- Reymond P, Kunz B, Paul-Pletzer K, Grimm R, Eckerskorn C, Farmer EE. 1996. Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphoprotrein with physical properties similar to viral movement proteins. Plant Cell 8:2265-2276.
- Riccardi F, Gazeau P, de Vienne D, Zivy M. 1998. Protein changes in response to progresive water deficit in maize. Plant Physiology 117:1253-1263.
- Rinaldo D, Mbéguié-A-Mbéguié D, Fils-Lycaon B. 2010. Advances on polyphenols and their metabolism in sub-tropical and tropical fruits. Trends in Food Science and Technology 21:599-606.
- Rocco M, D'Ambrosio C, Arena S, Faurobert M, Scaloni A, Marra M. 2006. Proteomic analysis of tomato fruits from two ecotypes during ripening. Proteomics 6:3781-3791.
- Rodríguez-Vargas S, Estruch F, Randez-Gil F. 2002. Gene expression analysis of cold and freeze stress in baker's yeast. Applied Environmental Microbiology 68(6):3024-3030.

- Rose JKC, Bashir S, Giovannoni JJ, Jahn MM, Saravanan RS. 2004. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. The Plant Journal 39:715-733.
- Rose JKC, Saladié M. 2008. Proteomic analysis and fruit ripening. Acta Horticulturae 682:211-224.
- Ross SJ, Finlay VJ, Malakasi P, Morgan BA. 2000. Thioredoxin peroxidase is required for the transcriptional response to oxidative stress in budding yeast. Molecular Biology of the Cell 11:2631-2642.
- Rui H, Cao S, Shang H, Jin P, Wang K, Zheng Y. 2010. Effects of heat treatment on internal browning and membrane fatty acid in loquat fruit in response to chilling stress. Journal of the Science of Food and Agriculture 90:1557-1561.
- Ruiz-Sola MA, Rodríguez-Concepción M. 2012. Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. The Arabidopsis book; e0158. http://dx.doi.org/10.1199/tab.0158.
- Ruoaz-Rivero O, Prat S. 1998. A 2308 deletion of the tomato LAP promoters is able to direct flower-specific and MeJA-induced expression in transgenic plants. Plant Molecular Biology 36:639-648.Renaut J, Lutss S, Hoffman L, Hausman JF. 2004. Responses of poplar to chilling temperatures: proteomics and physiological aspects. Plant Biology 6:81-90.
- Sabehat A, Lurie S y Weiss D. 1998. Expression of small heat-shock proteins at low temperature. Plant Physiol 117: 651-658.
- Sabehat A, Weiss D, Lurie S. 1996. The correlation between heat shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit. Plant Physiology 110:531-537.
- Sachetto-Martins G, Franco LO, de Oliveira DE. 2000. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? Biochimica et Biophysica Acta 1492:1-14.

- SAGARPA. 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Consultado el 10 de Octubre de 2015. Disponible en: http://siap.sagarpa.gob.mx
- Sakamoto A, Tsukamoto S, Yamamoto H, Ueda-Hashimoto M, Takahashi M, Suzuki H, Morikawa H. 2003. Functional complementation in yeast reveals a protective role of chloroplast 2-cys peroxiredoxin against reactive nitrogen species. The Plant Journal 33: 841-851.
- Saltveit ME Jr, Morris L. 1990. Overview on chilling injury of horticultural crops. En: Wang CY, editores. Chilling injury of horticultural crops. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. p 3-15.
- Salveit ME. 2000. Discovery of chilling injury. En: Kung SD, Yang SF, editores. Discoveries in plant biology. Vol III. Singapore. Word Scientific Publishing Co. p 423-448.
- Sánchez-Bel O, Egea I, Sánchez-Ballesta MT, Sevillano L, Bolarin MC, Flores FB. 2012. Proteome changes in tomato fruits prior to visible symptoms of chilling injury are linked to defensive mechanisms, uncoupling of photosynthetic process and protein degradation machinery. Plant Cell Physiology 53(2):470-484.
- Sargent SA, Moretti CL. 2004. Tomato. En Gross KC, Wang CY, Saltveit, editores. The commercial storage fruits, vegetables and florist and nursery stocks. Agriculture Handbook 66. Washington, DC: USDA agricultural research service. Disponible en: http://www.usna.usda.gov/hb66/tittle.html.
- Scandalios JG. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. Plant Physiology 101:7-12.
- Sevillano L, Sanchez-Ballesta MT, Romojaro F, Flores FB. 2009. Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. Journal of the Science of Food and Agriculture 89:555–573.
- Shao X, Tu K. 2013. Hot air treatment improved the chilling resistance of loquat fruit under cold storage. Journal of Food Processing and Preservation 38:694-703.

- Sharom M, Willemot C, Thompson JE. 1994. Chilling injury induces lipid phase changes in membranes of tomato fruit. Plant Physiology 105:305-308.
- Sharp RE, Hsiao TC, Silk WK. 1990. Growth of the maize primary root at low water potentials: II. Role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment. Plant Physiology 93:1337-1346.
- Sheoran IS, Olson DJ, Ross ARS, Sawhney VK. 2005. Proteome analysis of embryo and endosperm from germination tomato seeds. Proteomics 5:3752-3764.
- Shi J. 2000. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 40:1-42.
- Simonne AH, Behe BK, Marshall MM. 2006. Consumers prefer low-priced and high-lycopene-content fresh-market tomatoes. HortTechnology 16:674-681.
- Soleimani MA, Bodbodak S. 2014. Postharvest Heat Treatment for Mitigation of Chilling Injury in Fruits and Vegetables. Food Bioprocess Technology 7:37-53.
- Soto-Zamora G, Yahia EM, Brecht JK, Gardea A. 2005. Effects of postharvest hot air treatment on the quality of "Rhapsody" tomato fruit. Journal of Food Quality 28:492-504.
- Spooner DM, Peralta IE, Knapp S. 2005. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [Solanum L. section Lycopersicon (Mill.) Wettst.]. Taxon 54:43-61.
- Spreitzer RJ, Salvucci ME. 2002. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. Annual Review of Plant Biology 53:449-475.
- Srivastava S, Emery NRJ, Kurepin LV, Reid DM, Fristensky B, Kav NNV. 2006. Pea PR 10.1 is a ribonuclease and its transgenic expression elevates cytokinin levels. Plant Growth Regulation 49:17-25
- Süle A, Vanrobaeys F, Hajós G, Van Beeumen J, Devreese B. 2004. Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots. Phytochemistry 65:1853-63.

- Thomashow MF. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50:571-599.
- Thomashow MF, Gilmour SJ, Stockinger EJ, Jaglo-Ottosen KR, Zarka DG. 2001. Role of the Arabidopsis CBF transcriptional activators in cold acclimation. Physiologia Plantarum 112:171-175.
- Thornalley PJ. 1990. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. Biochemical Journal 269(1):1-11.
- Timperio AM, Egidi MG, Zolla L. 2008. Proteomics applied abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). Journal of Food Proteomics 71:391-411.
- Ukaji N, Kuwabara C, Takezawa D, Arakawa K, Fujikawa S. 2004. Accumulation of pathogenesis-related (PR) 10/Bet v 1 protein homologues in mulberry (Morus bombycis Koidz.) tree during winter. Plant Cell Environment 27:1112-1121.
- Umeda M, Hara C, Matsubayashi Y, Li HH, Liu Q, Tadokoro F, Aotsuka S, Uchimiya H. 1994. Expressed sequence tags from cultured cells of rice (Oryza sativa L) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engarged in ATP-generating pathways. Plant Molecular Biology 25: 469-478.
- UniProtKB U.S. 2015. UniProt. Uniprot Consortium. Disponible de http://www.uniprot.org/uniprot/K4CBD6. Consultado el 20 de diciembre de 2015.
- USDA. 2015. U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. USDA National Database for Standard Reference, Release 26. Nutrient Data Laboratory Home Page. Consultado el 18 de Octubre de 2015. Disponible en: http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl.
- Van Loon LC. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. European Journal of Plant Pathology 03:753-765.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu Rev Phytopathol 44:135-162

- Vega-Espinoza A. 2010. Aplicación de métodos secuenciales para la conservación postcosecha de tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Imperial. [Tesis de Maestría]. Culiacán, México: Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. 176 p.
- Vega-García MO, López-Espinoza G, Chávez-Ontiveros J, Caro-Corrales JJ, Delgado-Vargas F, López-Valenzuela JA. 2010. Changes in protein expression associated with chilling injury in tomato fruit. Journal of the American Society for Horticultural Science 135(1):83-89.
- Venema JH, Linger P, Van Heusden AW, Hasselt PR, Brüggenmann W. 2005. The inheritance of chilling tolerance in tomato (*Lycopersicon* spp.). Plant Biology 7:118-130.
- Vicente AR, Martínez GA, Chaves AR, Civello PM. 2006. Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage. Postharvest Biology and Technology 40:116-22.
- Wang W, Vignani R, Scali M, Cresti M. 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. Electrophoresis 27:2782-2786.
- Wang WX, Vinocur, B, Shoseyov, O, Altman A. 2004. Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. Trends in Plant Science. 9:244-252.
- Wang Y, Wisniewski M, Cui M, Webb R, Fuchigami L. 2005. Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress. Journal of the American Society for Horticultural Science 130(2):167-173.
- Wang Z, Li H, Ke Q, Jeong JC, Lee HS, Xu B, Deng XP, Lim YP, Kwak SS. 2014. Transgenic alfalfa plants expressing AtnDPK2 exhibit increased growth and tolerance to abiotic stresses. Plant Physiology and Biochemistry 84:67-77.
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock protein in plants. Journal of Experimental Botany 47:325-338.

- Weese TL, Bohs L. 2007. A three-gene phylogeny of the genus Solanum (Solanaceae). Systematic Botany 32:445–63.
- Weichmann J. 1987. Postharvest Physiology of vegetables. New York: Ed Marcel Decker. 597 p.
- Whitaker BD. 1994. A reassessment of heat treatment as a means of reducing chilling injury in tomato fruit. Postharvest Biology and Technology 4:75-83.
- White PJ, Broadley MR. 2003. Calcium in plants. Annals of Botany 92:1-25.
- Wills RBH, McGlasson WB, Graham D, Lee TH, Hall EG. 1989. Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables. Hong Kong, China: BSP Professional Books. p 174.
- Wise RR, Naylor AW. 1987. Chilling-enhanced photophylls. Chilling-enhanced photooxidation the peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. Plant Physiology 83:272-277.
- Wrigley CW. 1968. Gel electrofocusing: a technique for analyzing multiple protein samples by isoelectric focusing. Science Tools 15:17-23.
- Wrigley CW. 1970. Protein mapping by combined gel electrofocusing and electrophoresis: application to the study of genotypic variations in wheat gliadins. Biochemical Genetics 4:509-516.
- Wold AB, Rosendfeld HJ, Holte K, Baugerod H, Blomhoff R, Haffner K. 2004. Colour of post-harvest ripened and vine ripened tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as related to total antioxidant capacity and chemical composition. International Journal of Food Science and Technology 39:295-302.
- Xu J, Pascual L, Aurand R, Bouchet J-P, Valot B, Zivy M, Causse M, Faurobert M. 2013. An extensive proteome map of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit pericarp. Proteomics 13:3059-3063.
- Yates JR. 2000. Mass spectrometry from genomics to proteomics. Trends in Genetics 16(1): 5-8.

- Yan SP, Zhang QY, Tang ZC, Su WA, Sun WN. 2006. Comparative proteomics analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. Molecular Cell Proteomics 5:484-496.
- Yang J, Fu M, Zhao Y, Mao L. 2009. Reduction of chilling injury and ultraestructural damage in cherry tomato fruits after hot water treatment. Agricultural Science in China 8(3):304-310.
- Yano A, Umeda M, Uchimiya H. 1995. Expression of functional proteins of cDNA encoding rice nucleoside diphosphate kinase (NDK) in Escherichia coli and organ-related alteration of NDK activities during rice seed germination (Oryza sativa L.). Plant Molecular and Biology 27:1053-1058.
- Yu X, Ekramoddoullah AKM, Misra S. 2000. Characterization of Pin mIII cDNA in western white pine. Tree Physiology 20:663–671.
- Yu C, Wang HS, Yang S, Tang XF, Duan M, Meg QW. 2009. Overexpression of endoplasmic reticulum omega-3 fatty acid desaturasa gene improves chilling tolerance in tomato. Plant Physiology and Biochemistry 47:1102-1112.
- Yu F, Shao X, Yu L, Xu F, Wang H. 2015. Proteomic analysis of postharvest peach fruit subjected to chilling stress or non-chilling stress temperatures during storage. Scientia Horticulturae 197:72-89.
- Zhang Z, Nakano K, Maezawa S. 2009. Comparision of the antioxidant enzymes of broccoli after cold or heat shock treatment at different storage temperatures. Postharvest Biology and Technology 54:101-105
- Zhang X, Shen L, Li F, Meng D, Sheng J. 2013. Arginase induction by heat treatment contributes to amelioration of chilling injury and activation of antioxidant enzymes in tomato fruit. Postharvest Biology and Technology 79:1-8.
- Zhang Z, Shen L, Li F, Zhang Y, Meng D, Sheng J. 2010 Up-regulating arginasa contributes to amelioration of chilling stress and the antioxidant system in cherry tomato fruits. Journal of the Science of Food and Agriculture 90:2195-2202

- Zhao DY, Shen L, Fan B, Liu KL, Yu MM, Zheng Y, Ding Y, Sheng JP. 2009. Physiological and genetic properties of tomato fruits from 2 cultivars differing in chilling tolerance at cold storage. Journal of Food Science 74(5):348-352.
- Zimmermann S, Baumann A, Jaekel K, Marbach I, Engelberg D, Frohnmeyer H. 1999. UV-responsive genes of *Arabidopsis* revealed by similarity to the Gcn4-mediated UV response in yeast. The Journal of Biological Chemistry 274:17017-17024.
- Zou L, Li H, Ouyang B, Zhang J, Ye Z. 2006. Cloning and mapping of genes involved in tomato ascorbic acid biosynthesis and metabolism. Plant Science 170:120-127.
- Zubini P, Zambelli B, Musiani F, Ciurli S, Bertolini P, Baraldi E. 2009. The RNA hydrolysis and the cytokinin binding activities of PR-10 proteins are differently performed by two isoforms of the Pry p 1 peach major allergen and are possibly functionally related. Plant Physiology 150:1235-1247.

## **ABREVIATURAS**

% Por ciento, porcentaje

2D-PAGE Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (two

dimensional polyacrilamide gel electrophoresis)

ADN Ácido desoxirribonucleico

APX Ascorbato peroxidasa

ARN Ácido ribonucleico

ARNm Ácido ribonucleico mensajero

ATP Adenosín trifosfato (adenosine triphosphate)

CBF Factores de enlace C-repetidos (C-repeat binding factors)

CDPK Proteína cinasa dependiente de calcio (calcium dependent protein

kinase)

CHAPS Ácido 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-

propanosulfónico

cm Centímetro (s)

CMDH malato deshidrogenasa citosólica dependiente de NAD

CO<sub>2</sub> Dióxido de carbono

cv. Cultivar

DF Daño por frío

DTT Ditiotreitol

EST Segmentos de secuencias expresadas (expressed sequence tag)

FAO Organización de las naciones unidas para la agricultura y la

alimentación (food and agriculture organization of the united

nations)

g Gramo (g)

g Fuerza gravitacional

GR-RBP Proteína rica en glicina que se une al ARN (glycine-rich RNA-

binding protein)

GST Glutatión-S-transferasa

h Hora

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Peróxido de hidrógeno

HCI Ácido clorhídrico

HSP Proteína de choque térmico (inglés Heat Shock Protein)

IEF Isoelectroenfoque

kDa Kilodaltones

LAPs Leucin-Aminopeptidasas

LSD Diferencia mínima significativa (least significant difference)

M Molar, molaridad

m/z Masa/carga

mA Miliampere (s)

MAPK Proteína cinasa activada por mitógeno (mitogen-activated protein

kinase)

MMDH Malato deshidrogenasa mitocondrial

mg Miligramo (s)

min Minuto (s)

mL Mililitro (s)

mm Milímetro (s)

mM Milimolar

MS Espectrometría de masas (mass spectrometry)

MS/MS Espectrometría de masas en tándem

NDP Nucleósido difosfato

NDPK Nucleósido difosfato kinasa

Nitrógeno Nitrógeno

N Newton (s)

ng Nanogramo (s)

NO Óxido nítrico

No. Número

o Grado (s)

O<sub>2</sub> Oxígeno

°C Grado (s) centígrado (s)

OMS Organización Mundial de la Salud

pH Potencial de hidrógeno

pl Punto isoeléctrico

PM Peso molecular

PME Pectinmetil esterasa

PR Partícula reguladora

PRx Peroxiredoxina

Q Cuadrupolo (quadrupole)

QR Quinona reductasa u oxidoreductasa

Redox Óxido-reducción

RGG Arginina-Glicina-Glicina

ROS Especies reactivas del oxígeno (reactive oxygen species)

RP Proteínas relacionadas a patogénesis

RRM Motivo de reconocimiento del ARN (RNA recognition motif)

SDS Dodecil sulfato de sodio (sodium dodecyl sulphate)

sHSP Proteína de choque térmico de bajo peso molecular (small heat

shock protein)

SPR de RL Sociedad de producción rural de responsabilidad limitada

TDF Temperatura de daño por frío

TH Tratamiento hidrotérmico

TI Trampa de iones

ton Tonelada (s)

TPI Triosa fosfato isomerasa (triose phosphate isomerase)

TPx Tioredoxin peroxidasa

TR Temperatura de refrigeración

USA Estados Unidos de America (United States of America)

USDA Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United

States Department of Agriculture)

V Volt (s)

α Nivel de significancia

μg Microgramo (s)

μL Microlitro (s)