

Universidad Autónoma de Sinaloa

Facultad de Ciencias Químico Biológicas Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Análisis de expresión transcripcional de genes relacionados con la tolerancia al daño por frío en frutos de tomate cv. Imperial

TESIS

Que presenta

IBQ. Milton Vega Álvarez

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores

Dr. José Ángel López Valenzuela Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Bioquímica y Biología Molecular y de Fisiología y Tecnología Poscosecha de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección del Dr. José Ángel López Valenzuela y la Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo, así como la asesoría del Dr. Misael Odín Vega García. Contó con financiamiento del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI 2014/114) de la Universidad Autónoma de Sinaloa. El IBQ Milton Vega Álvarez 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>22</u> del mes <u>septiembre</u> del año <u>2016</u>, el (la) que suscribe <u>IBQ</u>. <u>Milton Vega Álvarez</u>, alumno (a) del Programa de <u>Maestría en Ciencia</u> <u>y Tecnología de Alimentos</u> con número de cuenta <u>0619883-1</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 Angel López Valenzuela y Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo</u> y cede los derechos del trabajo titulado "<u>Análisis de expresión transcripcional de genes relacionados con la tolerancia al daño por frío en fruto de tomate cy Imperial</u>", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

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. Milton Vega Álvarez

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 Dres. José Ángel López Valenzuela y Karen Virginia Pineda Hidalgo, 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 y a la Dra. 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. Muchas gracias.

Al Dr. Misael Odin Vega García por su valiosa asesoría durante la realización del proyecto de investigación, por abrirme las puertas del laboratorio y contribuir a mi crecimiento en el área profesional e investigación.

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 2014: Jesus, Cristian, Luis Bianca, Guadalupe, Alfa, Celeste, Pellegrini, Cristian, Alma, Gisela, Erika, David. Por todos esos momentos que compartimos en clase: cumpleaños, estrés, felicidad, estrés, TODO. Muchas gracias por todo ese tiempo brindado.

A mis amigos Cesar, Yessica, Pellegrini, Cristian, Alma, Gisela por su gran amistad, por compartir su alegría, entusiasmo y sobre todo por esa gran calidad humana. Muchas gracias.

A mis grandes amigo Erika y David, por su valiosa amistad desinteresada, por esas frases y risas inolvidables que perdurarán por los días, por estar conmigo apoyándome en las buenas y malas, durante un largo, largo, largoo tiempo. Muchas gracias y que la amistad perdure por mucho tiempo más.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: María Fernanda, Dennise, Alexis, María de Lourdes, Anayanci, Alejandro, Christian, Rodrigo, Alejandro, Itzel, David, Erika, 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 mis hermanos Elthon y Adan, muchas gracias por todo el apoyo que me han dado, por todos esos momentos que hemos compartido juntos y por siempre estar a mi lado. ¡Hermanos los lo queiro!

A mis padres, Oscar y Elvira 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 mí 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 mi abuela Andrea, porque desde que nací ha sido como una madre, por cuidarme y por brindarme todo el apoyo posible, usted ha sido parte muy importante de mi desarrollo personal y profesional, gran parte de lo que hoy soy se lo debo a usted. Abuela la AMO.

A Gaby, por haberme brindado todo su apoyo incondicional desde que la conocí y durante todo el transcurso 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 GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	٧
ÍNDICE DE CUADROS	vi
I RESUMEN	1
ABSTRACT	3
II INTRODUCCIÓN	5
III REVISIÓN DE LITERATURA	8
A GENERALIDADES DEL TOMATE	8
1 Origen	8
2 Descripción botánica	8
3 Importancia económica	12
4 Composición química y valor nutracéutico	15
5 Maduración	20
6 Manejo poscosecha de tomate	23
B DAÑO POR FRÍO	23
1 Mecanismos del daño por frío	25
a Cambios de fase de la membrana	26
b Estrés oxidativo	29
2 Tratamientos que brindan tolerancia al daño por frío	33
C CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON	38
SUSCEPTIBILIDAD Y TOLERANCIA A BAJAS TEMPERATURAS	

1 Transcriptómica en tomate expuesto a estrés por frío	45
2 Proteómica en tomate expuesto a estrés por frío	48
IV JUSTIFICACIÓN	51
V OBJETIVOS	52
A OBJETIVO GENERAL	52
B OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
VI MATERIALES Y MÉTODOS	53
A MATERIALES	53
B MÉTODOS	53
1 Aplicación de tratamiento hidrotérmico	53
2 Índice de daño por frío	53
3 Medición de parámetros fisiológicos	54
a Lixiviación de electrolitos	54
b Contenido de malondialdehido (MDA)	54
4 Extracción de ARN total	55
5 Tratamiento de ARN con DNAsa	56
6 Síntesis de ADNc	56
7 Análisis de expresión de genes relacionados con tolerancia al DF	57
8 Análisis estadístico	59
VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
A ÍNDICE DE DAÑO POR FRÍO	60
B PARÁMETROS FISIOLÓGICOS	64
1 Lixiviación de electrolitos (LE)	64

	2 Contenido de malondialdehido (MDA)	66
С	CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON	71
	ESTRÉS POR BAJA TEMPERATURA Y TOLERANCIA INDUCIDA AL	
	DAÑO POR FRÍO	
	1 Genes relacionados con respuesta al estrés	74
	a Proteína de choque térmico (HSP17.6)	74
	b Superóxido dismutasa (SOD)	79
	c Ascorbato peroxidasa (APX2)	81
	d Tioredoxin peroxidasa 1 (TPX1)	85
	e Glutatión-s-transferasa (GST)	88
	2 Genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos y energético	90
	a Triosa fosfato isomerasa (TPI)	90
	b Subunidad II del complejo citocromo c reductasa/peptidasa de	93
	procesamiento mitocondrial (β-MMP)	
	c Xilosa isomerasa (XI)	96
	3 Genes relacionados con regulación en la expresión génica	98
	a Proteína rica en glicina (GR-RBP)	98
	4 Genes relacionados con la maduración	100
	a Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACS4) y ácido 1-	100
	aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa (ACO1)	
	b Fitoeno sintasa 1 (PSY-1)	103
	c Poligalacturonasa (<i>PG</i>)	105

D CONSIDERACIONES SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y SU POSIBLE	108
RELACIÓN CON LA TOLERANCIA AL DAÑO POR FRÍO	
VIII CONCLUSIONES	112
IX BIBLIOGRAFÍA	114
ABREVIATURAS	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Descripción		
1	Representación esquemática del desarrollo del fruto a partir de la	11	
	polinización de la flor		
2	Corte longitudinal de un fruto de tomate	13	
3	Variabilidad en color, forma y tamaño de frutos de tomate maduros	14	
4	Índice de daño por frío (IDF) en frutos de tomate sin TH y con TH		
	almacenados durante 20 días a 5 °C, seguido de un periodo de		
	maduración por 7 días a 21 ºC		
5	Síntomas de daño por frío observados en frutos de tomate sin y con	62	
	TH almacenados durante 20 días a 5 °C, seguido de un periodo de		
	maduración por 7 días a 21 °C		
6	Lixiviación de electrolitos en frutos de tomate sin y con TH	65	
7	Contenido de malondialdehido (MDA) en frutos de tomate sin y con	68	
	TH		
8	Expresión relativa de genes relacionados con susceptibilidad y	73	
	tolerancia al DF en frutos de tomate cv Imperial con y sin		
	tratamiento hidrotérmico almacenados por 20 días a 5 °C		
9	Expresión relativa de genes relacionados con susceptibilidad y	75	
	tolerancia al DF en frutos de tomate cv Imperial con y sin		
	tratamiento hidrotérmico almacenados por 20 días a 5 °C más 7		
	días a 21 °C		

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	o Descripción		
1	Clasificación taxonómica del tomate		
2	Producción mundial de tomate durante el 2013		
3	Principales estados productores de tomate en México durante		
	2015		
4	Composición química del tomate fresco		
5	Descripción de las etapas de maduración del fruto de tomate		
6	Iniciadores utilizados para el análisis de expresión génica	58	
	mediante PCR en tiempo real		

I RESUMEN

El tomate (Solanum lycopersicum L.) es uno de los frutos de mayor consumo en el mundo, pero es susceptible al daño por frío (DF) cuando se expone a temperaturas menores de 12 °C, manifestándose en síntomas que disminuyen su calidad. Para inducir tolerancia al DF se han utilizado tratamientos hidrotérmicos (TH); en frutos de tomate dicha tolerancia se ha asociado con cambios en la acumulación de proteínas de choque térmico, enzimas del sistema antioxidante, metabolismo energético y regulación de la expresión génica. Sin embargo, no existen reportes que relacionen la expresión de los genes que codifican para estas proteínas con la tolerancia al DF en un fruto de tomate de importancia comercial. El objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión a nivel transcripcional de genes que codifican para proteínas previamente relacionadas con tolerancia al DF inducida por TH en frutos de tomate cv Imperial. Se seleccionaron frutos en estado de madurez fisiológica y se dividieron en dos lotes, de los cuales uno recibió TH (5 min, 42 °C) y el otro se utilizó como control (sin TH); ambos lotes fueron almacenados a 5 °C durante 20 días y posteriormente fueron sometidos a un periodo de maduración (7 días, 21 °C) para el desarrollo de síntomas. Se determinó el índice de DF (IDF), lixiviación de electrolitos (LE), contenido de malondialdehído (MDA) y la expresión transcripcional de genes que codifican para proteínas relacionadas con estrés térmico y oxidativo, regulación de la expresión génica, metabolismo de carbohidratos y maduración. Los frutos con TH mostraron valores menores de LE y MDA que los no tratados, lo cual se relacionó con una menor incidencia de síntomas y valor de IDF. Después de 20 días a 5 °C, los frutos con TH presentaron mayor expresión de genes que codifican para una proteína de choque térmico pequeña (HSP17.6), enzimas antioxidantes [thioredoxin peroxidasa 1 (TPX1), ascorbato peroxidasa (APX2) y glutatión-s-transferasa (GST)] y relacionadas con la regulación en la expresión génica [proteína rica en glicina que se une al ARN (GR-RBP)], así como enzimas del metabolismo de carbohidratos [xilosa isomerasa (XI)], biosíntesis de carotenoides [fitoeno sintasa (PSY-1)] y etileno [ACC oxidasa (ACO1); ACC sintasa (ACS4)]. Después del periodo de maduración, adicionalmente se encontró una mayor expresión del gen de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en los frutos con TH y menor incidencia de síntomas. Esto sugiere un papel importante de estas enzimas en la mayor tolerancia del tejido al frío, posiblemente a través del plegamiento correcto de proteínas, eliminación de radicales libres y regulación en la expresión génica a temperaturas bajas. Los frutos sin TH mostraron mayor incidencia de síntomas y mayor expresión de genes para las enzimas triosa fosfato isomerasa (TPI), subunidad II del complejo citocromo c reductasa/peptidasa de procesamiento mitocondrial (β-MPP) y poligalacturonasa (PG), lo cual podría relacionarse con una mayor necesidad energética, reemplazo de proteínas dañadas en mitocondria y pérdida de la integridad y turgencia celular resultado del estrés por frío. Los resultados sugieren que la tolerancia observada en los frutos con TH está asociada con la inducción en la expresión de genes de estrés térmico y antioxidantes, cuyos productos podrían estar actuando de manera conjunta para mantener la integridad de la membrana y homeostasis celular, preveniendo los síntomas de DF como maduración irregular mediante la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides y etileno.

ABSTRACT

Tomato (Solanum lycopersicum L.) is one of the most widely consumed fruit worldwide, but it is susceptible to chilling injury (CI) when is exposed to temperatures below 12 °C; this physiological disorder results in several symptoms that affect the fruit quality. Hydrothermal treatments (HT) have shown to reduce CI symptoms in tomato fruit, but the molecular mechanisms involved are poorly understood. This tolerance has been associated with differential accumulation of proteins involved in heat stress, antioxidant system, energy metabolism and regulation of gene expression in tomato fruit cv. Imperial; however there is no information about changes in gene expression related to CI tolerance in this commercially important tomato cultivar. The aim of this study was to analyze the expression at the transcriptional level of genes encoding proteins associated with CI tolerance induced by HT in tomato fruit cv. Imperial. Mature-green tomatoes were divided into two lots, one of which received a HT (42 °C, 5 min) and the other was used as control (WHT); both lots were stored at 5 °C for 20 days and then at 21 °C for 7 days for the development of CI symptoms. CI index (CII), electrolyte leakage (EL), malondialdehyde (MDA) content and the expression at the transcriptional level of genes encoding proteins related with oxidative and heat stress, gene expression regulation, carbohydrate metabolism and ripening were evaluated. HT fruits showed significantly lower values of EL and MDA than non-treated, wich were associated with lower incidence of CI symptoms and CII value. After 20 days at 5 °C, HT fruits showed higher expression of genes encoding a small heat shock protein (HSP17.6), antioxidant enzymes [thioredoxin peroxidase 1 (TPX), ascorbate peroxidase (APX2) y glutathione-s-

transferase (GST)], proteins involved in regulation of gene expression [glycine rich RNA-binding protein (GR-RBP)], carbohydrate metabolism [xylose isomerase (XI)] and the biosynthesis of carotenoids [phytoene synthase (PSY-1)] and ethylene [ACC oxidase (ACO1); ACC shyntase (ACS4)]. A higher expression of a gen encoding for superoxide dismutase enzyme (SOD) was also found in HT fruits with lower incidence CI symptoms. This suggests a key role of these enzymes in the adquisition of cold tolerance, perhaps through the correct folding of proteins, the removal of free radicals and regulation of gene expression at low temperatures. WHT fruits showed higher incidence of CI symptoms and higher expression of genes encoding for the enzymes triose phosphate isomerase, cytochrome c reductase-processing peptidase subunit II (β-MPP) and poligalacturonase (PG), which may be related with higher cell energy requirements, replacement of damaged proteins in the michocondria and the loss of integrity and cell turgor due to cold stress. The results of the present study suggest that CI tolerance in HT tomatoes is associated with the up-regulation of genes encoding proteins for heat and oxidative stress, which may be working together to maintain the cellular homeostasis and membrane integrity, preventing CI symptoms such as uneven ripening by the up-regulation of genes involved in carotenoid and ethylene biosynthesis.

II INTRODUCCIÓN

El tomate es uno de los frutos climatéricos más estudiados por su gran producción anual, versatilidad de usos y por ser una fuente importante de nutrimentos (vitaminas C, E y minerales) y compuestos bioactivos (licopeno, β-caroteno, compuestos fenólicos), estos últimos relacionados con la prevención de enfermedades crónico degenerativas. Su vida útil es relativamente corta una vez cosechado, por lo que un adecuado manejo poscosecha es de suma importancia para el mantenimiento de las características de calidad del fruto (Ding y col 2002). El almacenamiento a temperaturas bajas es la alternativa más eficiente para alargar la vida de anaquel del tomate por su efecto sobre la reducción de la tasa de respiración, transpiración, producción de etileno, maduración y desarrollo de pudriciones (Hardenburg y col 1986; Ball 1997); sin embargo, esto puede provocar un desorden fisiológico denominado daño por frío (DF), el cual implica cambios en el metabolismo celular, así como alteraciones en los niveles de transcritos y las proteínas para las cuales codifican, así como modificaciones postraduccionales de estas proteínas que en conjunto determinan el grado de daño o resistencia a las bajas temperaturas y la calidad de los frutos (Rugkong y col 2010; 2011).

Las respuestas fisiológicas al daño por frío han sido ampliamente revisadas; la primera está relacionada con alteraciones en la estructura, conformación y composición de la membrana celular y la segunda con una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Sevillano y col 2009). Se ha demostrado que tecnologías poscosecha como la aplicación de un TH previo al almacenamiento en frío disminuye los síntomas en frutos de tomate. Dicha tolerancia ha sido relacionada con una acumulación de proteínas de choque térmico

(HSPs) (Polenta y col 2007), metabolitos tales como ácido araquídico y ácido 2-cetoisocaproico (Luengwilai y col 2012), así como una mayor actividad de la enzima arginasa (Zhang y col 2013).

Estudios proteómicos en frutos de tomate almacenados en frío han revelado que los mecanismos de defensa o tolerancia al desorden están relacionados con la acumulación de HSPs, proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEAPs), chaperonas moleculares y enzimas antioxidantes y detoxificadoras (Page y col 2010; Vega-García y col 2010; Sánchez-Bel y col 2012; Valenzuela-Ponce 2016). En los últimos años, el enfoque transcriptómico ha permitido ampliar el conocimiento sobre las bases moleculares involucradas con la tolerancia o sensibilidad al DF en frutos de tomate. De los estudios transcriptómicos realizados bajo condiciones de DF destacan el realizado por Rugkong y col (2011) quienes analizaron el efecto de la baja temperatura sobre el transcriptoma durante la maduración de tomate (línea de introgresión M82IL2-2, S. lycopersicum x S. pennellii) y el de Cruz-Mendívil y col (2015), quienes evaluaron el efecto del TH sobre la expresión génica en tomate Micro-Tom almacenado a temperatura de DF (5 °C, 14 días) y posteriormente madurado por 14 días (20 °C). En estos estudios se encontró un cambio significativo en la activación y represión de un conjunto de genes involucrados en la sensibilidad o tolerancia al daño por frío (Síntesis de etileno: ACO1, ACS2 y ACS4; Metabolismo de la pared celular: PG, PE1, TBG4, y LeExp1; Síntesis de carotenoides: CRTISO, GGPPS2, DXS y PSY; Proteínas de choque térmico: HSPs y HSTFs). Ambas investigaciones representan un gran avance en cuanto al estudio de uno de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial; al mismo tiempo han permitido

proponer mecanismos relacionados con la aclimatación a las bajas temperaturas, responsables de la sensibilidad o tolerancia al DF. Sin embargo, estos estudios fueron realizados en frutos modelo y en lo que respecta a cultivares económicamente importantes son escasos los estudios realizados con este enfoque. Vega-García y col (2010) y Cárdenas-Torres (2013) utilizaron frutos de tomate cv Imperial para evaluar cambios en la acumulación de proteínas relacionados con la aclimatación a temperaturas bajas y el efecto de un TH previo al almacenamiento en frío sobre la actividad de enzimas antioxidantes, respectivamente. Ambos estudios sugirieron un papel importante de enzimas antioxidantes en la adquisición de tolerancia al DF. Recientemente Valenzuela-Ponce (2016) analizó cambios en el proteóma de frutos de tomate del mismo cultivar con y sin TH expuestos a temperaturas de DF, asociando la tolerancia al DF con una mayor acumulación de proteínas de choque térmico, enzimas del sistema antioxidante, metabolismo energético y regulación en la expresión génica. No obstante, no existe información acerca de la expresión de los genes que codifican para dichas proteínas en este cultivar que es de suma importancia económica para el estado de Sinaloa. Por ello, en el presente estudio se planteó analizar la expresión a nivel transcripcional de genes correspondientes a las proteínas previamente relacionadas con tolerancia al DF inducida por TH en frutos de tomate cv Imperial.

III REVISIÓN DE LITERATURA

A GENERALIDADES DEL TOMATE

1 Origen

El tomate tiene su origen en América del Sur, específicamente en la región Andina donde inició su domesticación, la cual finalizó en Mesoamérica (Blanca y col 2012). A Europa fue introducido por los Españoles después de la conquista de América en el siglo XVI y posteriormente se exportó a Italia, Francia e Inglaterra, siendo este último país el que dispersó el fruto al medio oriente y Asia, así como a América del Norte mediante la colonización británica (Bergougnoux 2014). El consumo de tomate se inició a finales del siglo XVII e inicios del XVIII, mientras que la producción comercial empezó un poco después de 1860, cuando finalmente fue aceptado por los consumidores. Desde 1890, se han llevado a cabo cruzas de tomate con la finalidad de desarrollar variedades que se adapten de mejor manera a las diferentes condiciones ambientales existentes alrededor del mundo (Orzolek y col 2006).

2 Descripción botánica

El tomate es un fruto tipo baya comúnmente cultivado, comercializado y consumido como una hortaliza. Pertenece a la familia de las solanáceas (Cuadro 1) integrada por más de 3,000 especies, incluyendo muchas plantas de importancia económica como la papa, berenjena, petunia, tabaco y pimiento (Barone y col 2009). La pertenencia a los géneros *Solanum* y *Lycopersicum* fue tema de discusión durante mucho tiempo, pero en los últimos años el uso de datos morfológicos y

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del tomate.

Categoría	Ejemplo
Reino	Plantae
Subreino	Traqueobinta
Superdivisión	Spermatophyta
Subdivisión	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	Solanum L.
Especie	Solanum lycopersicum L.

Fuente: NRCS-USDA (2016)

moleculares permitió realizar una revisión de la clasificación filogenética de las solanáceas generando una nueva clasificación molecular que colocó al tomate en el género *Solanum*, por lo que se ha admitido el nombre de *Solanum lycopersicum* para el tomate cultivado (Spooner y col 2005; Bergougnoux 2014).

El tomate proviene de una planta perenne herbácea de tallo voluble y largo, hojas lobuladas con los bordes dentados y puede desarrollarse de forma rastrera, semi-recta o erecta. En condiciones de crecimiento adecuadas, su sistema radical es fibroso y robusto, pudiendo llegar a medir de 1.2 a 1.8 m de profundidad. Los tallos son cilíndricos en plantas jóvenes y angulosos en plantas maduras, alcanzando una altura de 0.4 a 2 m (Esquinas-Alcázar y Nuez 1995; Valadez 1998). Su desarrollo se favorece por climas cálidos (21-23°C), ya que temperaturas inferiores a 12°C afectan su crecimiento y desarrollo (Criddle y col 1997; Jones 1999).

Los órganos reproductores tanto masculino como femenino se localizan en la flor de la planta, por lo que su reproducción ocurre principalmente por autogamia. Después de la polinización y fertilización tiene lugar el crecimiento del fruto mediante la división celular, seguido del aumento en el tamaño de las células, llegando por último a la maduración. El periodo de tiempo desde la polinización hasta la maduración varía entre 6 y 10 semanas dependiendo del cultivar y la temperatura (Valadez 1998; Tigchelaar 2001). El fruto de tomate se genera a partir de un ovario sincárpico, con dos o más cavidades con placenta carnosa que contiene numerosas y pequeñas semillas en forma de riñón cubiertas por diminutas vellosidades que a la vez están rodeadas por células de parénquima de textura gelatinosa que llenan las cavidades loculares (Figura 1). Estructuralmente hablando, el fruto se puede dividir

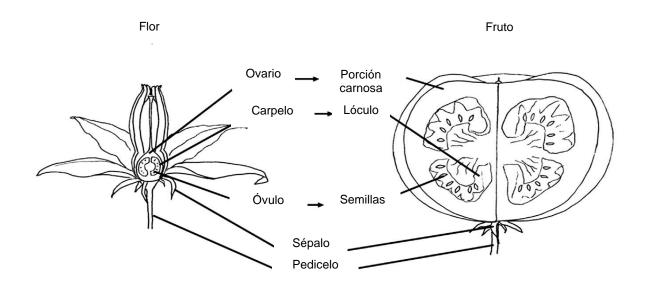


Figura 1. Representación esquemática del desarrollo del fruto a partir de la polinización de la flor.

Fuente: Bergougnoux (2014).

en dos partes principales que son el pericarpio y contenido locular (Figura 2) (Tanksley 2004). La coloración en estado maduro puede variar de rojo, rosa, naranja hasta amarillo (Figura 3) y se debe a la sustitución de clorofila en los cromoplastos de las células por carotenoides (amarillo-naranja), principalmente el licopeno que es responsable del color rojo característico de las variedades comerciales (Madhavi y Salunkhe 1998). Los frutos también varían en forma, desde redondos aplanados hasta redondos perfectos, redondos cuadrados, ovoides, en forma de pera y diferentes variaciones entre éstas (Figura 3) (Hobson y Grierson 1993).

El tomate tiene un genoma pequeño de aproximadamente 900 Mb que constituyen los 12 cromosomas de la planta; a partir de su decodificación se han predicho 34,727 genes que codifican para proteínas, de los cuales 30,855 fueron confirmados por secuenciación de ARN (The Tomato Genome Consortium 2012). Esta característica junto con la posibilidad de crecer en diferentes condiciones ambientales, su ciclo de vida relativamente corto, su insensibilidad a los fotoperiodos, su reproducción mediante autogamia, la facilidad de polinización e hibridación controlada y su capacidad para propagarse asexualmente por injerto, lo convierten en un sistema modelo para estudios de genética, desarrollo del fruto, metabolismo secundario, resistencia a enfermedades, domesticación y evolución (Labate y col 2007).

3 Importancia económica

El tomate es uno de los vegetales de mayor producción a nivel mundial, situándose solo por debajo de la papa. Su popularidad radica en la amplia versatilidad de usos que posee, ya que es utilizado tanto en

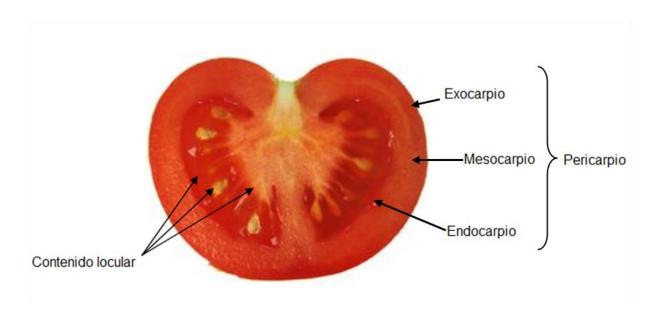


Figura 2. Corte longitudinal de un fruto de tomate.

Fuente: Madhavi y Salunkhe (1998).



Figura 3. Variabilidad en color, forma y tamaño de frutos de tomate maduros.

Fuente: Ren y col (2012).

fresco como en la fabricación de diversos productos procesados como pastas, puré, sopas, jugos, salsas, entre otros (Costa y Heuvelink 2005).

La producción mundial de tomate en el 2013 según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura) fue cercana a los 164 millones de toneladas (Ton), situándose China en el primer lugar con una producción de 50,552,200 Ton, seguido de India y Estados Unidos de América con 18,227,000 y 12,574,550 Ton, respectivamente. México ocupó el décimo lugar con una producción de 3,282,583 Ton (Cuadro 2) (FAOSTAT 2016).

En México, Sinaloa es el principal productor de tomate y de acuerdo con datos oficiales en el año 2015 contribuyó con el 31.9% de la producción nacional (Cuadro 3), alcanzando un rendimiento de 82.6 Ton/Ha (SIAP 2016). Con esta producción cubre tanto el comercio interno como externo, donde los principales mercados son Estados Unidos, Canadá y en menor proporción Europa y Asia en los meses de febrero, marzo y abril, lo que representa un ingreso anual de 4,079,856 millones de pesos. Otros estados importantes son Baja California, Zacatecas y Jalisco que en conjunto aportan cerca del 20% de la producción (Cuadro 3; SIAP 2016).

4 Composición química y valor nutracéutico

La composición química del tomate se ve influenciada por diferentes factores como diferencias genéticas, estado de madurez, condiciones ambientales y de cultivo, así como por las condiciones poscosecha (McGlasson 2003). En el Cuadro 4 se muestra la composición química de tomate fresco, cuyo principal componente 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

Cuadro 2. Producción mundial de tomate durante el 2013.

País	Producción (Ton)
China	50,552,200
India	18,227,000
EUA	12,574,550
Turquía	11,820,000
Egipto	8,533,803
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

Fuente: FAOSTAT (2016)

Cuadro 3. Principales estados productores de tomate en México durante 2015.

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

Fuente: SIAP (2016)

Cuadro 4. Composición química del tomate fresco.

Componente	Contenido por 100 g de tejido fresco
Componentes mayoritarios (g)	
Agua	94.52
Proteína (N 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

Fuente: USDA (2016).

sacarosa) (Madhavi y Salunkhe 1998). En menor proporción se encuentran una gran cantidad de compuestos entre los que resaltan los carotenoides, vitaminas, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, los cuales debido a sus características nutritivas y antioxidantes han sido relacionados con beneficios a la salud y prevención de enfermedades crónico degenerativas (Dumas y col 2003). El licopeno es el principal carotenoide presente en el tomate maduro (80-90% del total de pigmentos) y es responsable del color rojo característico (Torres y col 2003), así como de algunas actividades biológicas relacionadas con la prevención de enfermedades crónicas (cáncer de próstata, ovárico, gástrico, pancreático) y cardiovasculares como hipertensión, entre otras, en las cuales el estrés oxidativo es un importante factor etiológico (Waliszewski y Blasco 2010).

El licopeno es una molécula alifática lineal de 40 carbonos que posee en su estructura trece enlaces dobles de los cuales once son conjugados, lo que le confiere su alta actividad antioxidante. En tomate fresco esencialmente se encuentra unido a la matriz en configuración *trans* debido a su mayor estabilidad, aunque su biodisponibilidad es menor que la del isómero *cis* (Cruz-Bojórquez y col 2013). Otros carotenoides encontrados en menor cantidad son el fitoeno, fitoflueno, neurosporeno, ζ-caroteno, γ-caroteno, α-caroteno y β-caroteno, este último de suma importancia biológica por su actividad antioxidante y provitamina A (Madhavi y Salunkhe 1998; Takeoka 2001; Wold y col 2004; Van Meulebroek y col 2014).

Entre las vitaminas presentes en el fruto destacan las vitaminas C y E, que aunque se encuentran en pequeñas cantidades representan una fuente importante debido al alto consumo de tomate. La vitamina C es esencial para mantener las

funciones cardiovasculares del cuerpo humano, para el desarrollo de las células, tejido conectivo y utilización de hierro (Nishiyama y col 2004; Zou y col 2006), además de ser un removedor efectivo de radicales libres (Hanson y col 2004), así como un agente antiescorbuto (Omaye y Zhang 1998; Magiorkinis y col 2011). Por otro lado, la vitamina E es esencial para el buen funcionamiento neuronal posiblemente a través de contrarrestrar el estrés oxidativo al que el cerebro se encuentra expuesto, ya que es considerado un factor importante en el proceso de la neurodegeneración (Traber 1987; La Fata y col 2014). También está involucrada en la modulación de proteínas y enzimas relacionadas con la inflamación en el proceso de aterogénesis y es un potente inhibidor de la peroxidación de lípidos de membrana, ADN y proteínas, entre otras funciones (Chan 1998).

En cuanto a los principales compuestos fenólicos presentes en el fruto de tomate se encuentran la quercetina, naringenina, rutina y ácido clorogénico (Chassy y col 2006; Luthria y col 2006), los cuales debido a su anillo aromático característico son muy eficientes estabilizando radicales peróxido. En el caso particular de los ácidos clorogénicos, han sido relacionados con propiedades benéficas para la salud humana debido al poder antioxidante, así como hepatoprotector, hipoglucémico y de actividad antiviral que presentan (Farah y Donangelo 2006).

5 Maduración

La maduración es un proceso metabólico complejo y genéticamente programado que culmina con cambios de color, textura, sabor y aroma en los frutos frescos que los hacen aptos para el consumo humano. El tomate es un fruto climatérico cuya maduración se caracteriza por un aumento en la tasa de respiración

y biosíntesis de etileno, el cual es esencial para la maduración normal del fruto (Kevany y col 2007). La regulación de la síntesis de esta fitohormona se lleva a cabo por dos sistemas: el sistema 1 funciona durante el crecimiento vegetativo, donde el etileno funciona tanto para inhibir su síntesis como para producir los niveles basales detectados en los tejidos de la planta, mientras que el sistema 2 opera solo durante la maduración climatérica de los frutos y senescencia de algunos pétalos, donde el etileno autocataliza su producción (Lucille y Grierson 2002).

El proceso de maduración está acompañado de modificaciones en la estructura y composición de las paredes celulares, en el metabolismo de ácidos y azúcares, así como por la degradación de clorofila y biosíntesis de licopeno que definen el color del fruto (Madhavi y Salunkhe 1998). El color es el rasgo distintivo y más importante en la determinación del punto de maduración del tomate, el cual depende del contenido de carotenoides, principalmente licopeno y en menor proporción β-caroteno (Fraser y col 1994; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción 2012).

El estado de desarrollo en el que se cosecha el tomate varía desde su madurez fisiológica hasta su madurez completa de acuerdo a las preferencias del mercado, el tiempo que tarda en llegar el producto al consumidor y el objetivo de la producción, ya sea semillas, agroindustria o consumo en fresco (Sargent y Moretti 2004). Las diferentes etapas de cosecha son definidas de acuerdo a los estándares de la 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 5.

Cuadro 5. Descripción de las etapas de maduración del fruto de tomate.

Clase	Etapa de madurez	Descripción	Apariencia Física
1	Verde	Superficie del fruto completamente verde, variando desde tenue a oscuro.	4 S (S)
2	Rompiente	Cambio definido de verde a amarillo, rosa o rojo en no más del 10% del fruto.	
3	Cambiante	10 a 30% de la superficie se muestra amarilla, rosa, roja o una combinación de éstos.	
4	Rosa	30 a 60% del color superficial ha cambiado de verde a rosa o rojo.	A SEE
5	Rojo ligero	60 a 90% ha cambiado a rojo-rosado o rojo.	
6	Rojo maduro	>90% de la superficie es de color rojo	Constant of the second of the

Fuente: Adaptado de Grierson y Kader (1986).

6 Manejo poscosecha de tomate

La vida poscosecha se define como el periodo en el cual un producto mantiene un nivel predeterminado de calidad bajo condiciones específicas de almacenamiento (Shewfelt 1986). El tomate es un fruto altamente perecedero por lo que un buen manejo poscosecha es vital para evitar pérdidas relacionadas con la senescencia del fruto, así como con daños mecánicos, almacenamiento inadecuado, manipulación y transporte incorrecto (Ferreira y col 2005).

La temperatura junto con la humedad relativa representan los factores de mayor influencia sobre la vida útil y calidad del fruto, afectando al tiempo de comercialización que posee. El tomate normalmente es transportado, almacenado y distribuido a temperaturas entre 10 y 12 °C para controlar la maduración y mantener las características de calidad, ya que es susceptible a un desorden conocido como daño por frío que se presenta cuando los frutos son expuestos a temperaturas inferiores. Sin embargo, el periodo de almacenamiento que se logra 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 col 2002).

B DAÑO POR FRÍO

El almacenamiento a temperatura baja ha sido la principal estrategia aplicada en poscosecha para prolongar la vida útil de frutas y hortalizas y mantener su calidad, ya que la temperatura baja reduce la frecuencia respiratoria y minimiza las enfermedades fúngicas.

Sin embargo, existe un alto riesgo de que productos tropicales y subtropicales sufran daño por frío (DF) debido a la alta sensibilidad que presentan a la temperatura baja (Soleimani y Bodbodak 2014). Se puede describir al DF como un desorden fisiológico desarrollado en muchas plantas, así como en frutas y hortalizas, como resultado de su exposición a temperaturas bajas 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 aun 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 esta cae 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). La temperatura crítica se refiere a la temperatura mínima segura para el almacenamiento de frutos sin que se desarrollen síntomas de DF, la cual varía de acuerdo al producto y su grado de madurez (Wills y col 1989; Malacrida y col 2006). Los síntomas del DF se pueden clasificar en dos categorías: los síntomas de desarrollo o metabólicos con carácter cuantitativo, como maduración anormal y el pobre sabor y aroma, y los síntomas fisiológicos como picaduras, decoloración, descomposición interna, susceptibilidad a daños mecánicos y ataque de hongos (Sevillano y col 2009).

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 2014). Los síntomas visibles en este fruto provocados por el DF incluyen un pobre desarrollo de color y maduración irregular, podredumbre y picaduras en la epidermis del fruto, áreas sudadas, deterioro acelerado y una mayor susceptibilidad al ataque por patógenos como Alternaria tenuis (McColloch y Worthington 1952; Morris 1982; Luengwilai y col 2012). Estos síntomas generalmente aparecen cuando el tomate ha sido transferido a temperaturas superiores al DF (Morris 1982), provocando una disminución en la calidad y aceptación por el consumidor, resultando en pérdidas económicas considerables (Luengwilai y col 2012). Por lo anterior, el DF es uno de los principales factores que limitan la comercialización de frutas y hortalizas, así como 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 (Paull 1990; Park y col 2004).

1 Mecanismos del 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 temperaturas bajas es el evento primario que conduce al daño por frío (Lyons 1973; Raison y Orr, 1990; 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 Cambios de fase de la membrana

La membrana celular está compuesta principalmente de lípidos, proteínas y en menor grado glúcidos. La estructura y organización, así como sus propiedades están condicionadas fundamentalmente por la composición de los lípidos, los cuales son moléculas anfipáticas que se disponen formando una bicapa lipídica donde las partes hidrofóbicas se encuentran en el centro de la membrana y las hidrofílicas en contacto con el agua. Se ha reportado que temperaturas bajas alteran las propiedades físicas de los lípidos de la membrana, afectando su elasticidad, uniformidad, fluidez (Sharom y col 1994), composición (Kasamo y col 1992; Whitaker 1994; Lurie y col 1997) y permeabilidad, provocando un aumento en la lixiviación de electrolitos (González-Aguilar y col 2004; Malacrida y col 2006; Jing y col 2009), así como una disminución en la actividad de varias enzimas de la membrana incluyendo H*-ATPasa (Kasamo y col 2000).

Lyons (1973) postuló la teoría de las membranas en la cual intenta explicar los cambios fisiológicos y bioquímicos ocurridos cuando se presenta el daño por frío. En ella describe como evento molecular primario al efecto que posee la baja temperatura sobre las propiedades fisicoquímicas de los lípidos de la membrana, la cual experimenta una reorganización de los lípidos provocando un cambio en su estructura líquido-cristalina flexible a una estructura rígida llamada sólido-gel cuando se somete a temperaturas por debajo de la crítica, también llamada temperatura de transición. A medida que la temperatura se reduce y los lípidos de la membrana, en su mayoria saturados empiezan a solidificarse y la energía de activación (Ea) de los sistemas enzimáticos unidos a la membrana aumenta, conduciendo a una velocidad

de reacción menor y el establecimiento de un desequilibrio con los sistemas enzimáticos no unidos a la membrana, lo cual se refleja en una mayor acumulación de metabolitos como piruvato, acetaldehído y etanol como efecto muy temprano del DF. Si el almacenamiento a temperatura baja es demasiado prolongado y la temperatura de transición es alcanzada, las regiones de la membrana afectadas por la solidificación de los lípidos se extienden a la membrana entera, ocasionando pérdidas de elasticidad y fluidez debido a la peroxidación de lípidos, al aumento en el grado de saturación, a la degradación de fosfolípidos y galactolípidos y al aumento en la relación de esteroles/fosfolípidos (Sevillano y col 2009). Lo anterior conduce al mal funcionamiento de la membrana provocando trastornos funcionales de las proteínas membranales y finalmente la ruptura de esta misma, provocando con ello fugas de agua, iones y de metabolitos desde el interior de la célula (Lyons 1973; Sharom y col 1994).

Una forma de estimar el daño de las membranas es midiendo la lixiviación de electrolitos, ya que es un parámetro que indica de manera adecuada el nivel de daño existente en la estructura membranal (Marangoni y col 1995). Zhao y col (2009a) 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 temperatura baja. Malacrida y col (2006) reportaron la misma tendencia en la lixiviación de electrolitos en tomate cv. Micro-Tom almacenado a temperaturas de DF.

Otro buen indicador del daño de membranas celulares es el nivel de malondialdehído (MDA), ya que es el producto final de la peroxidación de los ácidos

grasos de la membrana que es responsable de la pérdida de la integridad (Wise y Naylor 1987; Hodges y col 1999). La cantidad de MDA se utiliza como un marcador de estrés oxidativo, cuyo aumento señala 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). Entre los diversos estudios en donde se ha aplicado una tecnología poscosecha con el fin de incrementar la tolerancia al DF y observar el efecto del mismo sobre los parámetros fisiológicos y de calidad, destacan los realizados por Jing y col (2009) y Cárdenas-Torres (2013) en frutos de tomate cv cerasiforme Alef e Imperial, respectivamente. En estos estudios se observó que el tratamiento hidrotérmico (TH) no afectó negativamente los atributos de calidad como firmeza y pérdida de peso, si no que favoreció el desarrollo de la coloración roja durante la maduración y disminuyó la lixiviación de electrolitos (LE) y contenido de MDA. Jing y col (2009) también observaron que el TH protegió las membranas de algunos organelos al mantener la estructura de doble membrana presente en mitocondria e intacta la del retículo endoplasmático, evidenciándose de esta manera el efecto protector del tratamiento sobre las membranas celulares. Al mismo tiempo se demostró que la LE y MDA 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

El estrés oxidativo es el estado celular caracterizado por un exceso en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), producto natural del metabolismo de este elemento, y una reducción en la respuesta antioxidante. Este fenómeno junto con las modificaciones en la estructura de membrana provocadas por el enfriamiento, son los responsables de la pérdida de la integridad, ya que el estrés por frío aumenta los niveles de ROS que estimulan la peroxidación de lípidos en las membranas celulares (Sevillano y col 2009). La acumulación de ROS tales como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), oxígeno singulete y radicales superóxido (O²⁻) e hidroxilo (OH·) conducen a la oxidación de moléculas esenciales para la supervivencia de la célula, como los lípidos de membrana y proteínas; así también provocan la inhibición de la actividad enzimática y en el peor de los casos ocasionan daño al ARN y ADN, provocando la muerte celular (Scandalios 1993; Mittler 2002).

En las células vegetales mantenidas bajo condiciones normales, la acumulación de ROS se debe principalmente a la fuga inevitable de electrones del O₂ en la cadena de transporte de electrones en los cloroplastos y mitocondrias y/o por la activación de NADPH oxidasas situadas en las membranas celulares implicadas en la peroxidación de lípidos de membrana y producción del anión superóxido (Bhattacharjee 2012), mientras que la acumulación de ROS en células vegetales expuestas a condiciones de DF se debe, además de los factores anteriormente mencionados, a un exceso en la reducción de oxígeno del fotosistema I en los cloroplastos y por la deficiencia en el transporte de electrones durante la fosforilación oxidativa llevada a cabo en la mitocondria, consecuencia de la pérdida de la funcionalidad de proteínas de membrana que participan en el proceso (Purvis y Shewfelt 1993; Mittler 2002). Estos cambios en la constitución y la funcionalidad de las mitocondrias y cloroplastos, causan una producción anormal de ROS y por lo tanto un estrés oxidativo en los tejidos. Se ha reportado que los cloroplastos son organelos especialmente sensibles al daño por frío en cultivos como pimiento y tomate (Allen 1995; Mittler 2002).

Las plantas se protegen del estrés oxidativo de dos maneras diferentes; la primera es la activación de la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en evitar el escape de ROS tales como oxidasas alternas (AOX), las cuales representan una ruta alternativa para el transporte de electrones en la mitocondria bajo condiciones de estrés, catalizando la transferencia de estos directamente al oxígeno molecular para producir agua y evitar la acumulación de ROS (O2⁻). La segunda forma de defensa contra el estrés oxidativo es mediante la

inducción de la expresión génica o el incremento en la actividad enzimática de proteínas pertenecientes al sistema antioxidante, tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión-S-transferasa (GST) y glutatión reductasa (GR), siendo SOD, CAT y algunas peroxidasas (POD) las principales enzimas involucradas en la sensibilidad o tolerancia al DF (Wang 1995; Kerdnaimongol y Woodson 1999; Sala y Lafuente 1999; Møller 2001). Diversos estudios han corroborado la importancia de dichas enzimas en la respuesta al estrés oxidativo provocado por el DF, donde CAT parece ser una de las primeras y principales enzimas del sistema antioxidante de la planta que se activa en respuesta a dicho estrés (Sevillano y col 2009). Kerdnaimongol y Woodson (1999) evaluaron la importancia de la enzima antioxidante catalasa en la eliminación de ROS producidas durante el DF en tomate transgénico, mediante la supresión del gen que codifica para esta enzima (CAT1) utilizando la tecnología de RNA antisentido. Los resultados mostraron una mayor sensibilidad al H₂O₂ por parte de las plantas de tomate en la que se suprimió el gen CAT1 en comparación con las plantas control. La actividad de la enzima resultó ser tan importante que las plantas genéticamente modificadas no sobrevivieron a la exposición a temperaturas bajas. Otro estudio es el realizado por Malacrida y col (2006) quienes evaluaron la respuesta del sistema antioxidante de frutos de tomate cv Micro-Tom al estrés por frío (24 días a 4 °C), encontrando una mayor actividad enzimática de las proteínas CAT y GR en respuesta al estrés generado por el almacenamiento a temperaturas bajas. En este mismo sentido, Gómez y col (2009) reportaron un aumento de la

actividad enzimática de SOD y APX en frutos de tomate en estado rompiente como respuesta inmediata al estrés oxidativo provocado por la refrigeración.

El ciclo ascorbato-glutatión representa otro mecanismo importante en la eliminación de ROS en las plantas, cuya activación parece producir un efecto positivo al inhibir el desarrollo del DF. Walker y McKersie (1993) evaluaron la importancia de la actividad del ciclo ascorbato-glutation en la eliminación de ROS en tomates resistentes (L. hirsutum) y sensibles (L. esculentum) al DF. Los resultados fueron concluyentes al observar una mayor actividad de las enzimas pertenecientes al ciclo ascorbato/glutation por parte del cultivar resistente, demostrando la importancia de dichas enzimas en la tolerancia al DF. Algo similar fue reportado por Wang y col (2005) quienes sobreexpresaron un gen de ascorbato peroxidasa (APX) citosólica en plantas transgénicas de tomate, las cuales mostraron un incremento en la actividad de la enzima y a su vez fueron tolerantes a las temperaturas bajas. Por su parte, Cárdenas-Torres (2013) utilizó un tratamiento hidrotérmico en tomate cv Imperial para incrementar la tolerancia al DF, la cual se evidenció por una menor fuga de electrolitos y peroxidación de lípidos; dicha protección de la membrana celular se relacionó con la activación de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y APX. En este mismo sentido, Valenzuela-Ponce (2016) reportó una mayor acumulación de las enzimas superoxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y tioredoxin peroxidasa1 (TPX) en tomate del mismo cultivar tratado hidrotérmicamente y lo asoció con la menor incidencia de los síntomas del DF presentada por los frutos.

2 Tratamientos que brindan tolerancia al daño por frío

Los trastornos causados por las temperaturas bajas durante la maduración y senescencia de productos hortícolas sensibles a la refrigeración afectan negativamente su calidad y por lo tanto su comercialización (Lafuente y Zacarias 2006; Mulas y Schirra 2007). Actualmente existen diversas tecnologías que retrasan el desarrollo de DF durante el almacenamiento; algunas de ellas son de naturaleza física y consisten principalmente de cambios en la temperatura, la humedad relativa o la composición gaseosa de la atmósfera durante el almacenamiento (Sevillano y col 2009).

El tratamiento con temperaturas altas constituye una estrategia ampliamente utilizada en poscosecha para el control de enfermedades por la inhibición directa del patógeno y para estimular ciertos mecanismos del producto con el fin de mejorar su respuesta a diferentes tipos de estrés como las temperaturas bajas (Lurie y Sabehat 1997; Soto-Zamora y col 2005). Se han empleado diferentes métodos para la aplicación de altas temperaturas, destacando el tratamiento hidrotérmico, el tratamiento con vapor y con aire caliente (Lurie 1998; Porat y col 2000).

Los tratamientos hidrotérmicos (TH) se aplican por inmersión de los productos en agua caliente con una duración de pocos minutos, ya que el agua es un medio de transferencia de calor más eficiente que el aire (Lurie 1998). Estos representan uno de los métodos más utilizados debido a las ventajas que poseen como lo es el no afectar la calidad del fruto, fácil aplicación, bajo costo, eliminación de patógenos y reducción de la aparición de síntomas de DF durante el almacenamiento a

temperaturas bajas (Schirra y D'hallewin 1997; McDonald y col 1999; Cárdenas-Torres 2013).

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(unSFA)/saturados(SFA) debido a una mayor actividad de las ácido grasos desaturasas (FADS) y una disminución en la actividad de enzimas responsables de la degradación de los unSFA como la fosfolipasa D (PLD) y lipoxigenasa (LOX) (Los y Murata 1998; Yu y col 2009; Rui y col 2010; Hernández y col 2011); (2) mayor expresión génica de proteínas de choque térmico (HSP), las cuales funcionan como chaperonas moleculares para mantener la estabilidad de las proteínas (Thomashow 1999) mediante el reconocimiento y unión a proteínas incompletamente plegadas para evitar su agregación y facilitar su renaturalización y plegamiento correcto (Ellis y Van der Vies 1991; Craig y col 1994; Lee 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 unSFA/SFA como 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, esta última involucrada en la regulación osmótica entre el citoplasma y 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;

Zhang y col 2010; Zhang y col 2013; Soleimani y col 2014); (5) 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), aunque 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) y prevenir el desarrollo de pudriciones (Fallik 2004). Henríquez y col (2005) evaluaron la magnitud del DF en frutos de tomate cv Dominique sometidos a dos diferentes tratamientos térmicos, tratamiento con aire caliente (24 h a 38 °C y 6 h a 42 °C) y tratamiento hidrotérmico (2 min a 48 °C, 2 min a 50 °C y 15 min a 50 °C) previo al almacenamiento a 2 °C por 21 días en contraste con los no tratados; los autores encontraron que los tomates sin tratamiento térmico presentaron mayor daño, punteado, marchitamiento y pérdida de peso que los tomates sometidos al tratamiento con aire o inmersión en agua caliente. Por otra parte, Jing y col (2009) evaluaron el efecto de la aplicación de un TH (40, 45 °C por 5 y 15 min) sobre los síntomas del DF en tomate cherry. Estos autores observaron que el tratamiento inducía una mayor tolerancia al DF y 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, encontraron que al aplicar un TH con diferentes tiempos y temperaturas de inmersión (3-9 min a 30-50 °C) disminuía el desarrollo de síntomas de DF y el daño a membranas celulares, evidenciado por una menor lixiviación de electrolitos. Cárdenas-Torres (2013) evaluó el efecto del TH (5 min a 42 °C) en frutos de tomate cv Imperial almacenados a temperatura de DF (15 días a 5 °C); este estudio evidenció el efecto benéfico del TH al reducir el desarrollo de síntomas y lograr una mejor retención de la calidad, lo cual se relacionó con menor daño de membranas e incremento en las actividades de SOD, CAT y APX. Por su parte, Zhang y col (2013) y Cruz-Mendívil y col (2015) evaluaron el efecto del tratamiento con aire caliente e hidrotérmico sobre la expresión génica en frutos de tomate cy Messina y Micro-Tom respectivamente, los cuales fueron almacenados a temperaturas de daño por frío (5 y 2 °C) durante 28 y 14 días, con un periodo adicional de maduración de 3 y 14 días a 20 °C; ambos autores observaron un efecto protector de los tratamientos térmicos 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 fuga de electrolitos y contenido de MDA. Los resultados mostraron que el tratamiento con aire caliente indujo la expresión de genes que codifican enzimas de detoxificación, mientras que el tratamiento hidrotérmico además favoreció la expresión de genes relacionados con estrés térmico y metabolismo de azúcares y reprimió algunos del metabolismo de lípidos y de la pared celular.

Recientemente, Valenzuela-Ponce (2016) evaluó los cambios en los parámetros fisiológicos [lixiviación de electrolitos y contenido de malondialdehído (MDA)] y acumulación de proteínas en frutos de tomate cv Imperial con y sin TH (5 min, 42 °C) almacenados durante un periodo de 20 días a temperatura de daño por frío (5°C) y temperatura de refrigeración (12 °C), más un periodo de maduración de 7 días a 21 °C. Los resultados revelaron que la aplicación del TH no tuvo efecto negativo sobre la calidad de los frutos y resultó benéfica al disminuir los síntomas visibles de DF, evidenciándose por los valores menores de lixiviación de electrolitos y peroxidación de lípidos en los frutos con TH respecto a los no tratados. El análisis proteómico arrojó un total de aproximadamente 300 proteinas, de las cuales 26 se encontraron acumuladas diferencialmente entre los frutos con y sin TH almacenados bajo condiciones de DF; los frutos sin TH y con mayor incidencia de síntomas de DF presentaron una mayor acumulación de proteínas relacionadas con la producción de energía y metabolismo de carbohidratos (triosa fosfato isomerasa y enolasa), así como de detoxificación (Lactoil-glutation liasa) y de procesamiento de proteínas (Leucino aminopeptdasa 2 cloroplástica, Subunidad II del complejo citocromo c reductasa/peptidasa de procesamiento mitocondrial), las cuales podrían ayudar a compensar las mayores necesidades energéticas y de detoxificación ocasionadas por el daño de los tejidos. En lo que respecta a la mayor tolerancia al daño por frío presentado por los frutos sometidos a TH, esta se asoció con una mayor acumulación de proteínas de choque térmico (HSP 17.7, HSP17.7 y HSP60), proteínas relacionadas con la patogénesis (remorina, PRP10), metabolismo de carbohidratos y producción de energía (xilosa isomerasa, nucleosido difosfato kinasa), así como una proteína rica en glicina de unión al ARN (GR-RBP) y enzimas de carácter antioxidante (SOD, APX y TPX). La acción conjunta de estas proteínas podría estar ayudando a mantener la homeostasis celular bajo condiciones de estrés por frío, al disminuir el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), evitar la desnaturalización de proteínas y ayudar en el plegamiento correcto de las mismas. A pesar de los estudios anteriores, a la fecha no existen reportes acerca del efecto del tratamiento hidrotérmico sobre la expresión génica en un cultivo de suma importancia económica para Sinaloa como lo es el tomate cv Imperial. Resulta de especial interés relacionar los cambios en la expresión de genes que codifican las proteínas previamente asociadas con tolerancia al DF inducida por la aplicación de un TH, lo cual podría ser de gran ayuda para comprender de mejor manera los mecanismos moleculares involucrados en dicha tolerancia.

C CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON SUSCEPTIBILIDAD Y TOLERANCIA A BAJAS TEMPERATURAS

Las plantas han desarrollo diferentes mecanismos de defensa como respuesta a los diversos tipos de estrés bióticos y abióticos que enfrentan donde se desarrollan, lo que les proporciona la capacidad de sobrevivir a dichas condiciones. Los cambios en la expresión de genes, así como en la acumulación y modificación postraduccional de proteínas son en gran medida los principales mecanismos de defensa por parte de la planta (Timperio y col 2008).

La exposición a temperaturas bajas representa uno de los tipos de estrés abiótico más común y de mayor impacto sobre el ciclo de vida de la planta. Los

efectos provocados por estas temperaturas varían desde una simple anomalía en la planta hasta la muerte de la misma, por lo que el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia o sensibilidad a esta condición es esencial para el desarrollo de cultivares resistentes al daño por frío.

En los últimos años se han identificado una gran cantidad genes, proteínas y rutas metabólicas involucradas en la percepción y transducción de señales como respuesta de las plantas a las temperaturas extremas (Sung y col 2003). Diferentes estudios enfocados en el análisis de la transducción de señales hacia el núcleo en plantas expuestas a temperatura baja mostraron una correlación entre la disponibilidad del calcio, la expresión genética durante la aclimatación al frío y el desarrollo de la tolerancia al DF, lo que evidencia la importancia del calcio como mensajero en la cascada de transducción de señales a temperatura baja (Monroy y col 1993). Se ha observado que las células presentan una regulación diferencial de los miembros de una familia de genes de la proteína quinasa dependiente de calcio durante las primeras etapas de aclimatación fría (Monroy y Dhindsa 1995).

COR (regulación por frío) representa una superfamilia de genes cuya expresión ha sido relacionada con una mayor tolerancia a las bajas temperaturas (Thomashow 1990). Su activación se debe a la expresión de genes que codifican para factores de transcripción como *ICE1* y *CBF1*; el primero codifica para un factor de transcripción tipo MYC el cual potencializa la expresión del segundo gen, que codifica para un factor de transcripción de unión a un elemento regulador *cis* (CTR; Repetición C o DRE; elemento sensible a deshidratación) (Baker y col 1994) que posee esta familia (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 1994; Miura y col 2012).

En lo que respecta al cultivo de tomate, se han identificado una gran cantidad de genes relacionados con la diferencias en sensibilidad o tolerancia al daño por frío que presentan los diversos cultivares. Al parecer la inducción de la expresión de los genes LeICE1 y LeCBF1 representa una de las primeras respuestas por parte de la planta y fruto de tomate a la exposición a bajas temperaturas, este último ha sido relacionado al mismo tiempo con la producción endógena de etileno (Zhao y col 2009b; Miura y col 2012). En este sentido, genes que codifican para proteínas fotosínteticas como la subunidad pequeña RuBisCO 3B, ferredoxina-NADP(+)oxidorreductasa, glicolato oxidasa, proteína de unión a la clorofila a/b y proteína del centro de reacción de PSII, son los principales que se encuentran expresados diferencialmente en plantas de tomate durante la aclimatación a las bajas temperaturas. Una menor represión en la expresión de estos genes podría ser vital para la supervivencia de la planta bajo condiciones de estrés por frío, debido posiblemente a que con esto podría cubrir de mejor manera sus requerimientos energéticos. En cuanto a la eliminación de ROS, se ha observado que los principales expresados diferencialmente corresponden a glutation-s-transferasa, genes anteriormente relacionada con tolerancia al DF en tabaco (Le Martret y col 2011), así como genes que codifican para las enzimas peroxidasas (POD) y CAT (Liu y col 2012).

Las fitohormonas son de suma importancia al participar en una gran cantidad de mecanismos moleculares y ser necesarias para el desarrollo normal de la planta y/o fruto, por lo que la regulación en la expresión de los genes relacionados con su metabolismo es vital en la tolerancia o sensibilidad al DF. Dentro de los principales

genes del metabolismo de hormonas expresados diferencialmente en la planta de tomate sometida a temperaturas bajas se encuentra un gen homólogo al *ABA3* de *Arabidopsis*, el cual codifica para una proteína sulfurasa necesaria para la biosíntesis del ácido abscísico y cuya represión ha sido relacionada con una menor expresión de genes relacionados con la respuesta a las bajas temperaturas y una mayor sensibilidad al DF en *Arabidopsis* (Xiong y col 2001). Otros genes expresados diferencialmente estan involucrados en la síntesis de ácido jasmónico y codifican para lipoxigenasas y 12-oxofitodienato reductasas. El ácido jasmónico es esencial en la regulación de la respuesta de defensa sistemática por parte de la planta de tomate, así también se ha relacionado con una mayor expresión de los genes leucina aminopeptidasa A1 (*LASP-A1*), *JA2*, proteína relacionada con la patogénesis (*PRs*) y fenil alanina amonio liasa (*PAL*), cuya expresión se ha reportado ser mayor en genotipos de tomate con mayor tolerancia al estrés por frío en comparación con genotipos sensibles (Liu y col 2012).

Como se mencionó anteriormente, el calcio parece jugar un papel muy importante en la compleja cascada de señalización molecular durante la aclimatación de la planta a las temperaturas bajas. En el caso del cultivo de tomate se han reportado diferencias significativas en cuanto a la expresión de genes que codifican para proteínas de unión al calcio y calmodulina; estos funcionan como sensores de los cambios de concentración de Ca⁺² y están relacionados con la regulación en la expresión de genes corriente abajo (Reddy y col 2011; Liu y col 2012).

En el fruto de tomate también se ha observado la expresión diferencial de una gran cantidad de genes al someterlo a condiciones de estrés por frío, entre los que

se encuentran *ACS2, ACS4* y *ACO1* que codifican para las enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa involucradas en la biosíntesis de etileno (Rugkong y col 2011; Cruz-Mendívil y col 2015), así como genes relacionados con la transducción de señales durante la maduración del fruto (Proteínas receptoras de etileno: *LeETR1, NR,* Proteínas kinasas: *LeCTR1,* Factores de transcripción: *LeEIL2, LeEIL3, LeEIL4, LeMADS-RIN*), por lo que esta hormona podría estar jugando un papel muy importante en el desarrollo del DF (Rugkong y col 2011).

PSY1, CRTISO, GGPP y DXS representan los principales genes pertenecientes a la ruta de biosíntesis de carotenoides cuya expresión se ve fuertemente afectada por las bajas temperaturas. PSY1 codifica para la enzima fitoeno sintasa que cataliza el primer paso en la biosíntesis de carotenoides y produce fitoeno a partir de la condensación de dos moléculas de geranil-geranil pirofosfato (GGPP); CRTISO codifica para una carotenoide isomerasa, enzima que isomeriza los enlaces cis del licopeno a trans. GGPPS2 codifica para GGPP sintasa necesaria para la biosíntesis de GGPP, sustrato de fitoeno sintasa y por último, DXS codifica para 1 deoxi-D-xilosa 5-fosfato sintasa involucrada en la biosíntesis de isopentenil pirofosfato (IPP), precursor de GGPP. Con respecto al metabolismo de la pared celular, se ha encontrado que la expresión de los genes PG, PE1, TBG4 y LeEXP1 que codifican para las enzimas poligalaturonasa, pectin esterasa, βgalactosidasa y expansinas es alterada por las bajas temperaturas, lo que explica en cierta medida los cambios observados en firmeza en los frutos de tomate almacenados a temperatura de DF. PG codifica para la enzima poligalacturonasa encargada de hidrolizar el polímero compuesto de ácido galacturónico

(homogalacturonanos) mientras que PE codifica para la enzima pectin metilesterasa relacionada con la remoción de los grupos metilo unidos al homopolímero de ácido galacturónico, incrementando su susceptibilidad a la acción de PG; *TBG4* codifica para β-galactosidasa, enzima relacionada con la liberación de la galactosa presente en los galactanos que a la vez forman parte de las pectinas. Por último, la expansina codificada por *LeEXP1* está involucrada en la pérdida de la estructura de la pared celular al alterar el acceso de diversas enzimas a sus sustratos (Rugkong y col 2011; Cruz-Mendvil y col 2015).

El efecto del estrés por frío sobre la expresión de genes también se ha observado en aquellos que codifican para enzimas metabólicas con posibles funciones tipo chaperona (dehidrina DHN10 y homólogo de dehidrina Ci7; proteínas de choque térmico HSP20, HSP70 y HSP90) (Weiss y Egea-Cortines 2009; Caffagni y col 2014; Cruz-Mendívil y col 2015), enzimas del sistema antioxidante (ascorbato peroxidasa, thioredoxinas y glutatión S-transferasa), metabolismo de lípidos (lipoxigenasa C; TomloxC, fosfolipasa A2, acyl-CoA thiolesterasa, triacylglicerol lipasa, subunidad α del complejo de oxidación de los ácidos grasos) y el metabolismo de alcoholes relacionados con cambio en el perfil de compuestos aromáticos (alcohol deshidrogenasa; ADH2 y alcohol acyl transferasa; ATT) (Rugkong y col 2011; Cruz-Mendívil y col 2015).

El conocimiento cuali y cuantitativo sobre los genes existentes en el genoma del tomate y otras plantas, se debe en gran parte al desarrollo tecnológico de las ciencias ómicas, sobre todo la transcriptómica, la cual representa una herramienta de gran utilidad debido a las grandes ventajas que posee, tales como realizar

aproximaciones cuantitativas de los genes existentes en un genoma e identificar aquellos que se expresan bajo condiciones específicas; también permite realizar un mapeo de genes nuevos en los cromosomas, la identificación de diferentes isoformas, la determinación de las diferentes funciones que poseen los ARN, entre otras aplicaciones. Entre las tecnologías desarrolladas para el estudio del trancriptoma se encuentran principalmente las basadas en la hibridación y las basadas en la secuencia del ARN; las primeras implican la incubación del ADNc marcado con un agente fluoróforo y el microarreglo que contienen los oligos complementarios al ADNc, lo que produce una emisión de fluorescencia proporcional a la expresión genética o cantidad de ADNc presente. El microarreglo de ADNc representa uno de los métodos por hibridación más utilizados por su alto rendimiento y costo relativamente barato, pero presenta las desventajas de poseer un rango limitado de detección debido al ruido y saturación de señales y la necesidad de conocer el genoma del organismo en cuestión, limitando así su rango de aplicación (Wang y col 2009; Haider y Pal 2013). Por otro lado, la secuenciación de secuencias expresadas (EST), el análisis serial de la expresión de genes (SAGE), la secuenciación masiva en paralelo (MPSS) y PCR en tiempo real (qRT-PCR) representan algunas tecnologías que determinan directamente la secuencia de ADNc. La técnica de qRT-PCR es una de las más utilizadas debido a su alta precisión y rendimiento en la medición de la expresión génica; sin embargo, al igual que todas las tecnologías posee sus desventajas, como lo son la dificultad de mapear porciones pequeñas de ADNc amplificados en sus respectivos genomas, el

análisis se realiza en un solo transcrito y es difícil distinguir entre diferentes isoformas presentes (Wang y col 2009).

1 Transcriptómica en tomate expuesto a estrés por frío

Diversos estudios transcriptómicos realizados en tomate han ayudado a comprender y dilucidar los diferentes mecanismos implicados en la sensibilidad o tolerancia al DF. Zhao y col (2009a) evaluaron la expresión del gen *LeCBF1* en frutos de 2 cultivares que difieren en la tolerancia al frío, *S. lycopersicum* cv Santiam de mayor tolerancia y *S. lycopersicum* cv Lichun de menor tolerancia; los autores observaron que *LeCBF1* se expresó después de un periodo más corto de exposición a la baja temperatura en el cultivar Santiam con respecto a Lichun de menor tolerancia al frío, lo que se correlacionó con la mayor resistencia al DF presentada por los frutos. Posteriormente, Zhao y col (2009b) observaron que la expresión de *LeCBF1* era dependiente de la producción endógena de etileno en lo frutos, lo cual se pudo evidenciar al encontrar que la aplicación exógena de etileno aumentaba la expresión del gen disminuyendo los síntomas del DF, mientras que la aplicación de 1-metilciclopropeno (inhibidor de etileno) reducía la expresión e incrementaba los síntomas de DF.

Weiss y Egea-Cortines (2009) caracterizaron el transcriptoma de plantas y frutos de tomate (Micro-Tom y Demisem) durante la maduración en condiciones de estrés por frío (48 horas a 6 °C), encontrando aumentos en la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas (ARN ribosomal 25S, proteínas ribosomales L10, L27, S11, S13 y endonucleasas), metabolismo de carbohidratos (almidón fosforilasa, triosa fosfato isomerasa y aldo/ceto reductasa), mitocondria (ATP sintasa

cadena beta) y cloroplasto (proteína de unión a clorofila A-B). Al analizar el perfil de transcritos, se sugirió que el gen que codifica para un homólogo de dehidrina de papa (*Ci7*) pudiera funcionar como marcador en el estudio de la respuesta al estrés y que el mecanismo de aclimatación o respuesta a las temperaturas bajas por parte del fruto parece ser diferente al de la planta ya que esta no presentó un aumento significativo en la expresión de dicho gen.

Rugkong y col (2011) reportaron que la maduración no uniforme de frutos de tomate (línea de introgresión M82IL2-2, *S. lycopersicum x S. pennellii*) almacenados a 3 °C por dos o más semanas se debía a cambios en la expresión de genes relacionados con la señalización del etileno (*LeETR1* y *NR*) y con factores de transcripción (*LeMADS-RIN*) necesarios para la expresión de genes asociados con la biosíntesis de esta fitohormona (*ACO1*, *ACS2* y *ACS4*) y carotenoides (*CRTISO*, *GGPPS2* y *DXS*), así como con el metabolismo de la pared celular (*PG*, *PE1*, *TBG4*, y *LeExp1*) y características sensoriales (*TomloxC*, *ADH2*, y *ATT*).

Por otro lado, con el fin de analizar diferencias transcripcionales en cultivares de tomate con diferente grado de tolerancia al DF, Liu y col (2012) evaluaron la expresión génica de tres genotipos de plantas de tomate expuestos a temperatura de DF (4 °C) durante 0, 1, 3, 5 y 7 días; utilizaron dos parentales, *S. habrochaites* como resistente (LA1777) y *S. lycopersicum* (LA4024) como sensible, así como una línea que poseía una introgresión de *S. habrochaites* en el cromosoma 12 (LA3969). Los resultados obtenidos mostraron un menor daño de la membrana celular, una menor inhibición del PSII y menor actividad de APX en los genotipos resistentes (LA1777 y LA3969) en comparación con el sensible (LA4024). Encontraron 92 genes

expresados diferencialmente entre ambos genotipos, entre los cuales se encontraron factores de transcripción (MYBs, HSFs, WRKYs, NACs y dedos de Zinc) que causan la expresión de una gran cantidad de genes que codifican para proteínas como HSPs, PRs y dehidrinas; también observaron una mayor expresión de genes relacionados con la fotosíntesis (FNR, GOXs y RuBisCo 3B), eliminación de especies reactivas de oxígeno (PODs y GSTs), metabolismo y señalización de hormonas (ABA3, LOXs y UGTs) y otras enzimas metabólicas (PAL y BAM).

Caffagni y col (2014) evaluaron la expresión de genes candidatos inducidos por bajas temperaturas y especies reactivas de oxígeno producidas bajo estas condiciones en plantas de dos cultivares de tomate, Albenlga (resistente) y Marzano (sensible), expuestos durante 2, 4, 8, 24 y 72 horas a temperatura de DF (1 °C), así como después de transferirlos a temperatura de maduración (25 °C) durante 11 días. Encontraron mayores niveles de expresión de los genes *LeCBF1* y *LeFAD7*, genes COR (dehidrina homóloga a *Ci7* y DHN10) y genes mediados por ROS (*BZIP* y MYB) en el cultivar tolerante en comparación con el sensible. Además, observaron una inducción más rápida en la expresión de los genes que codifican para las familias de los factores de transcripción ERF y dedo de zinc C2H2 en cv. Albenlga. El factor de transcripción dedo de zinc C2H2 está relacionado con la expresión de genes que codifican para proteínas de aclimatación a las bajas temperaturas (WRCOR413) y con proteínas transmembrana que participan en la señalización a diferentes estreses abióticos (COR413) (Zhang y col 2011a).

Otro estudio muy interesante es el realizado por Zhang y col (2013) quienes evaluaron la actividad y expresión (*LeARG1 y LeARG2*) de enzimas arginasas, así

como la acumulación de metabolitos relacionados con el metabolismo de arginina en tomate *Solanum lycopersicum* L. cv Messina tratados con aire caliente (38 °C, 12 h) y que presentaron cierta tolerancia al DF al almacenarlos durante 21 y 28 días a 2 °C. Los resultados mostraron una mayor expresión de estos genes, así como una mayor actividad enzimática en los tomates tratados con aire caliente en comparación con los no tratados (control) durante todo el periodo de almacenamiento, coincidiendo a la vez con una mayor acumulación de prolina y putresina, metabolitos anteriormente relacionados con una mayor tolerancia al DF.

Recientemente, Cruz-Mendívil y col (2015) realizaron un análisis transcriptómico comparativo entre frutos de tomate (*S. lycopersicum* cv. Micro-Tom) con y sin TH previo al almacenamiento en frío. Ellos asociaron la tolerancia al frío en frutos tratados con la inducción de la expresión de genes relacionados con estrés térmico (*HSP* y *HSTF*), detoxificación (*GST*), metabolismo de azúcares (*TPP* y *ALDOSA 1-EPIMERASA*), biosíntesis de carotenoides (*PSY*) y etileno (*ACO y ACS*).

A pesar de los estudios anteriormente mencionados, hasta el momento no se ha evaluado la expresión de genes candidatos responsables de la tolerancia o sensibilidad al DF en un genotipo de tomate de importancia económica y agronómica para Sinaloa como lo es el cultivar Imperial. En este sentido, resulta interesante relacionar los cambios en la expresión de estos genes con la tolerancia inducida al DF en el fruto por medio de la aplicación de un TH.

2 Proteómica en tomate expuesto a estrés por frío

Al igual que la transcriptómica, la proteómica resulta ser una herramienta muy útil en la investigación de los diferentes mecanismos moleculares relacionados con respuesta a ambos tipos de estrés, biótico y abiótico. 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 el estrés por frío inhibió la expresión de proteínas relacionadas 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). 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. Las proteínas expresadas diferencialmente estuvieron involucradas en dos funciones biológicas importantes: 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 a la fecha son escasas las investigaciones enfocadas en la identificación de proteínas asociadas con la tolerancia al DF inducida mediante tratamientos hidrotérmicos. Recientemente, Valenzuela-Ponce (2016) realizó un análisis proteómico comparativo entre frutos de tomate cv Imperial con y sin TH almacenados durante 20 días a 5°C y un posterior periodo de maduración (7 días a 21 °C). En dicho estudio, los frutos de tomate TH presentaron menor incidencia de síntomas de DF y menores valores de fuga de electrolitos y peroxidación de lípidos, lo cual fue asociado con la acumulación diferencial de proteínas relacionadas con estrés térmico (sHSP y HSP) y oxidativo (SOD, APX y TPX), con el metabolismo de carbohidratos (Triosa fosfato isomerasa, Subunidad II del complejo citocromo c reductasa/peptidasa de procesamiento mitocondrial y Xilosa isomerasa) y con una proteína involucrada en la regulación en la expresión génica (GR-RBP). A pesar de lo anteriormente mencionado, no se tiene conocimiento si la acumulación diferencial de estas proteínas corresponde con una inducción en la expresión de los genes que las codifican, lo cual sería de gran ayuda para un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia al estrés por frío inducida por la aplicación de un TH. 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 al ser un fruto climatérico es susceptible al DF lo que representa un problema tanto para productores como para comerciantes, ya que limita su vida útil al no poder utilizar temperaturas inferiores a los 12 °C durante su almacenamiento y distribución poscosecha. La aplicación de tratamiento hidrotérmico (TH) ha resultado efectivo en la reducción de los síntomas de DF al conferirle al fruto mayor tolerancia a las bajas temperaturas manteniendo la calidad del mismo.

Estudios previos en nuestro laboratorio han analizado cambios en el proteoma de frutos de tomate cv Imperial relacionados con el estrés por frío (5 °C) y la tolerancia al DF inducida por un tratamiento hidrotérmico. Si bien estos estudios han permitido identificar proteínas relacionadas con la susceptibilidad y tolerancia a este desorden en los frutos de tomate, no existe información sobre los cambios de expresión de genes relacionados con tolerancia al DF en este cultivar de tomate que es de suma importancia económica para el estado de Sinaloa. Por ello, en el presente estudio se planteó analizar la expresión a nivel transcripcional de los genes correspondientes a proteínas acumuladas diferencialmente en los frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* cv Imperial) tratados hidrotérmicamente antes de ser sometidos a temperaturas de DF (5 °C), lo cual podría ser de gran ayuda para un mejor entendimiento de los mecanismos implicados en la tolerancia al DF inducida por el TH.

V OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión a nivel transcripcional de genes asociados con tolerancia inducida al daño por frío mediante tratamiento hidrotérmico en frutos de tomate cv Imperial (*Solanum lycopersicum* L.).

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el índice de daño por frío y parámetros fisiológicos (lixiviación de electrolitos y contenido de malondialdehído) en frutos de tomate con y sin TH almacenados por 20 días a 5 °C y después de un periodo de maduración de 7 días a 21 °C.
- 2. Determinar la expresión de genes que codifican para proteínas de choque térmico (HSP17.6), sistema antioxidante (GST, APX2, TPX1, Cu-Zn SOD), metabolismo de carbohidratos (TPI, β-MPP, XI) y pared celular (PG), biosíntesis de carotenoides (PSY-1) y etileno (ACS4 y ACO1) en frutos de tomate con y sin TH almacenados por 20 días a 5 °C y después de 7 días a 21 °C.
- 3. Evaluar la relación entre los niveles de transcritos y los parámetros evaluados en frutos con y sin TH almacenados durante 20 días a temperatura de DF y después de un periodo de maduración de 7 días a 21 °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. Se seleccionaron frutos con ausencia de daños y defectos y con una coloración y tamaño uniformes, los cuales fueron lavados con agua y jabón, sumergidos en 200 ppm de hipoclorito de sodio por 3 min y secados. Se realizó una selección final y los frutos se dividieron en dos lotes, uno de ellos se utilizó como control y el otro recibió un TH (42 °C por 5 min). Ambos lotes fueron almacenados durante 20 días a temperatura de daño (5 °C), seguido de un periodo de maduración (7 días a 21 °C).

B MÉTODOS

1 Aplicación de tratamiento hidrotérmico

Los frutos fueron sumergidos durante 5 min en un baño de acero inoxidable que contenía agua a una temperatura de 42 °C (Cárdenas-Torres 2013) y posteriormente fueron enfriados a temperatura ambiente (25 °C) durante 30 min. Se retiró el exceso de humedad de los frutos utilizando toallas de papel.

2 Índice de daño por frío

Se determinó el índice de daño por frío de acuerdo a lo reportado por Vega-García y col (2010). Los criterios utilizados 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 reflejó el nivel de daño de cada fruto para cada criterio en porcentaje (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:

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

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

3 Medición de parámetros fisiológicos

a Lixiviación de electrolitos

La evaluación de electrolitos se realizó siguiendo la metodología reportada por Zhao y col (2009a) con ciertas modificaciones. Se tomaron cilindros de tejido fresco de la región ecuatorial con un diámetro de 5 mm y 10 mm de longitud, se lavaron con agua desionizada y luego se colocaron en 25 mL de una solución de manitol 0.1 M en la cual 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 en la solución de manitol fueron sometidos a 121 °C por 10 min en una autoclave con el fin de liberar el total de electrolitos. La muestra se dejó enfriar a 25 °C y se midió la conductividad de la solución. La lixiviación se reportó como el porcentaje de electrolitos lixiviados con respecto al total de electrolitos.

b Contenido de malondialdehido (MDA)

El contenido de MDA, un indicador de la peroxidación de lípidos, se determinó de acuerdo con Hodges y col (1999). Se homogeneizó 1 g de tejido congelado con

10 mL de una mezcla de etanol:agua (80:20, v/v) y se centrifugó a 3000 g durante 10 min (Eppendorf, Mod 5804 R, Hamburg, Alemania). Se tomó una alícuota de 1 mL de la muestra y se añadió a un tubo de ensayo conteniendo 1 mL de solución (i) –TBA, compuesta de 20 % (p/v) ácido tricloroacético y 0.01 % de hidroxitolueno butilado, o bien (ii) +TBA, que contenía todo lo anterior más 0.65 % de ácido tiobarbitúrico. Las muestras se agitaron vigorosamente e incubaron a 95 °C por 25 min, se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 3000 g durante 10 min. Se registró la absorbancia a 440, 532 y 600 nm. Los equivalentes de MDA fueron 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

4 Extracción de ARN total

El ARN se extrajo utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, EUA) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Primeramente las muestras de pericarpio de tomate fueron molidas en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual fue almacenado a -70 °C hasta su posterior uso. Para la extracción del ARN total, se mezclaron 500 mg de tejido molido con 1 mL de Trizol en un tubo de 2 mL, se incubó por 5 min y luego se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4 °C (Labnet Prism, Mod C2500-R, Edison, EUA). El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se agregaron 0.4 mL de cloroformo y se incubó por 3 min, seguido de centrifugación a 12,000 g por 15 min a 4 °C. Se tomó la fase acuosa superior y se agregaron 0.5 mL de isopropanol frío al 100%, se incubó por 10 min en hielo y se

centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 mL de etanol frío al 75% y se centrifugó a 7,500 g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y se dejaron los tubos abiertos de 5 a 10 min para evaporar el etanol residual. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 25 μ L de agua libre de ribonucleasa y se dejó en reposo a temperatura ambiente.

5 Tratamiento de ARN con DNAsa

El ARN resuspendido fue tratado con DNAsa para eliminar el ADN genómico presente en la muestra. Se utilizó el kit DNase I (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). A 1-2 μg de ARN total se le agregó 1 μL de amortiguador de reacción 10X, 1 μL de DNAsa I (1 U/μL) y 6 μL de agua tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC). La mezcla se incubó 15 min a temperatura ambiente, se añadió 1 μL de la solución de paro y se incubó 15 min a 65°C; finalmente se colocó en hielo hasta llevar a cabo la síntesis de ADNc.

6 Síntesis de ADNc

La síntesis del ADNc se realizó utilizando el kit Go ScriptTM Reverse Transcription System (Promega, Madison, EUA). Se tomaron 8 μL del RNA tratado con DNAsa I y se le agregó 1 μL de primer oligo (dT)₁₅ (500 μg/mL), la mezcla se incubó 5 min a 70 °C e inmediatamente después se colocó en hielo durante 5 min; posteriormente se centrifugó 10 s y se colocó en hielo. En otro tubo se preparó la mezcla de reacción de transcripción reversa, la cual consistió de 4 μL de amortiguador de reacción 5X, 3 μL de MgCl₂ (25 mM), 1 μL de mezcla de nucleótidos (dNTPs) (10 mM), 2 μL de inhibidor de ribonucleasas (20 U/μL) y 1 μL de la enzima transcriptasa reversa (RT) (200 U/μL). Los contenidos de ambos tubos se

combinaron para tener una mezcla de reacción final de 20 µL, la cual se incubó a temperatura ambiente durante 5 min (etapa de alineamiento), seguido de otra incubación a 42 °C por 50 min (etapa de extensión) y finalmente se inactivó la enzima transcriptasa reversa por calentamiento a 70 °C por 15 min; la mezcla de ADNc se almacenó a -70 °C hasta su posterior uso.

7 Análisis de expresión de genes relacionados con tolerancia al DF

Para el análisis de expresión de genes de los frutos tratados y sin tratar hidrotérmicamente a los diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. El ADNc fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro BioMate 3s (Thermo Scientific, Madison, EUA). A partir de 75 ng de ADNc se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa; se utilizó el kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) para el marcaje de los productos de la reacción y la amplificación se realizó en un sistema de tiempo real modelo StepOne (Applied Biosystems). Los iniciadores de PCR utilizados fueron diseñados a partir de ADNc de proteínas previamente asociadas con tolerancia inducida al DF por un tratamiento hidrotérmico en frutos de tomate cy Imperial (Valenzuela-Ponce 2016), utilizando el Primer-BLAST disponible programa en la página http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ (Cuadro 6). Estos fueron diseñados a una temperatura de alineamiento de 60 °C para amplificar una región de 100-300 pb. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C (15 s) y 60 °C (1 min) con una velocidad de rampa de 2.2 °C/s.

Cuadro 6. Iniciadores utilizados para el análisis de expresión génica mediante PCR en tiempo real.

Nombre del gen	Nombre corto	Iniciador directo (5'-3')	Iniciador reverso (5´-3´)
Proteína de choque térmico de bajo peso molecular	HSP17.6	GATGGAGAGAGGGTTGGGAA	AATTGTTTTGGGTTTCTTTGGC
Superoxido dismutasa Cu-Zn	SODCu-Zn	CAACTAGCGGTGGTGTCTGT	CAGCAAAGCTAACACAGCCC
Ascorbato peroxidasa 2	APX2	TCAACTACTATGGGCAAGTCCTATC	TGGTCACAGCCCTTGGTGGCA
Thioredoxin peroxidasa 1	TPX1	CCTCCCAAGTGTTCTGGCTC	CGCTACTGTCCACACCTCAC
Glutation-s-transferasa	GST	GGTGATTTTGTTGGATTTTTGG	AGCAGAGGCTTTTGTTCG
Triosa fosfato isomerasa	IPI	TTGCATGTTGGGGAGACT	TGTACTTCCTGGGCTTGTGC
Subunidad II del complejo citocromo c reductasa/peptidasa de procesamiento mitocondrial	МРР	TCCAGGGAGCAACAGCATA	TTCGACCTCCTCCATCTCCC
Xilosa isomerasa	×	GGCACCAATTCCCTGGCTAT	GGAGCGATGTCCCTATCGTG
Proteína rica en glicina que se enlaza al ARN	GR-RBP	GCAAGCCATGAGGGATGCTA	GCGGTCACCTCCTCCATAAC
Aminocicloporpano sintasa 4	ACS4	TTGCGACGAAATATATGCTGCT	CACTCGAAATCCTGGAAAACCT
Aminocicloporpano oxidasa 1	AC01	GCTCATACAGACGCAGGAGG	CAATAGAGTGGCGCATGGGA
Fitueno sintasa 1	PSY1	TAGCACAGGCAGGTCTATCCGATG	TCACGCCTTTCTCTGCCTCATCAA
Poligalacturonasa	ЬG	AGAGCCCAAATACTGATGGA	CATGACCTGGACCACAAGTAA

Las curvas de fusión se obtuvieron por calentamiento de 65 °C a 95 °C con una velocidad de rampa de 0.5 °C/s.

Los niveles de expresión de los genes analizados se calcularon usando como control interno el gen *UBI3* (ubiquitina), el cual se ha encontrado que varía muy poco entre los materiales estudiados. Para cada gen analizado, el valor del ciclo umbral promedio (Ct) se calculó con tres réplicas para cada tratamiento.

La expresión relativa fue calculada usando la ecuación:

$$2[(wx-wc)-(gx-gc)]$$

En donde:

X= Gen de interés

C= Gen control UBI3

W= Promedio de los Ct de frutos sin TH

G= Promedio de los Ct de frutos con TH

8 Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió en una ANOVA unifactorial completamente al azar, donde el factor fue el tratamiento poscosecha con dos niveles (con y sin TH) y las variables de respuesta el índice de daño por frío (IDF), lixiviación de electrolitos (LE), contenido de malondialdehido (MDA) y expresión génica. Se llevó a cabo una comparación de medias mediante la prueba de Fisher con un α=0.05. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion versión 15.2.06 (Stat Point Technologies, Inc. Warrenton, VA, USA).

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A ÍNDICE DE DAÑO POR FRÍO

El índice de daño por frío (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 presentada por los mismos. El IDF se calculó con base en una escala hedónica que incluye los principales síntomas en frutos de tomate. La evaluación de este índice en los frutos con y sin TH almacenados durante 20 días a temperatura de daño por frío (5 °C) se realizó después del periodo de maduración a 21 °C, ya que los síntomas normalmente se visualizan de mejor manera una vez que el fruto se encuentra a temperaturas superiores a las de DF.

En la Figura 4 se muestran los resultados de IDF para los tomates con y sin TH. El valor de IDF obtenido para los tomates sin TH fue significativamente (P<0.05) mayor que el de los tratados hidrotérmicamente; los principales síntomas visuales del daño fueron maduración irregular y marchitez (Figura 5). En el caso de los tomates con TH no se observó marchitamiento y presentaron una maduración más uniforme, lo cual se vió reflejado en un valor significativamente menor de IDF, demostrando así el efecto benéfico de la aplicación del tratamiento hidrotérmico en la reducción de los síntomas de daño por frío en estos frutos.

La presencia de síntomas de daño por frío ya ha sido reportada anteriormente por diversos investigadores en frutos de tomate de diferentes cultivares, los cuales se agravan conforme aumenta el tiempo de exposición a las bajas temperaturas. En este sentido, Vega-García y col (2010) reportaron un incremento en el IDF de frutos

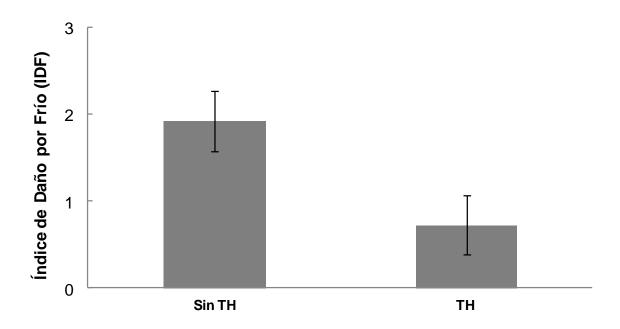


Figura 4. Índice de daño por frío (IDF) en frutos de tomate sin TH y con TH almacenados durante 20 días a 5 $^{\circ}$ C, seguido de un período de maduración por 7 días a 21 $^{\circ}$ C. Las barras verticales indican LSD= 0.684 (α =0.05).



Figura 5. 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.

de tomate cy Imperial conforme transcurría el tiempo de almacenamiento a 5 °C. En otro estudio realizado por Cárdenas-Torres (2013) en el mismo cultivar se observó que la aplicación de un tratamiento hidrotérmico confería al fruto cierta tolerancia al daño por frío, al observar mayor incidencia de síntomas de DF en frutos de tomate sin tratamiento hidrotérmico respecto a los tratados a partir del día 10 de almacenamiento a 5 °C. Resultados similares fueron observados por Valenzuela-Ponce (2016), quien reportó un IDF significativamente menor en frutos de tomate cv Imperial sometidos a un TH con respecto a los no tratados después de que fueron almacenados por 20 días a 5 °C. En cuanto a otros cultivares, Zhang y col (2013) reportaron un valor mayor de IDF en tomates cy Messina sin tratamiento térmico con respecto a los tratados después de 21 y 28 días de almacenamiento a 5 °C. En el mismo sentido, Cruz-Mendívil y col (2015) reportaron que la aplicación de un TH (7 min, 40 °C) en tomate Micro-Tom redujo significativamente los síntomas de DF en frutos almacenados durante 14 días a 5 °C en comparación con frutos control. Cabe destacar que los valores de IDF y los tiempos de exposición a temperatura baja para manifestar los síntomas varían entre los diferentes estudios, lo cual podría atribuirse a las diferencias genéticas entre los cultivares, las condiciones de cultivo y el estado de madurez en el cual los frutos fueron cosechados.

Los resultados del presente estudio corresponden con estudios previos, ya que la aplicación del TH confiere tolerancia al DF en los frutos de tomate como se pudo evidenciar por una menor incidencia de los síntomas asociados al mismo.

B PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

1 Lixiviación de electrolitos (LE)

La lixiviación de electrolitos (LE) es un parámetro fisiológico ampliamente utilizado en el análisis de DF y tolerancia a temperaturas bajas en una gran cantidad de frutos (Sevillano y col 2009; Soleimani y col 2014), ya que frecuentemente está relacionado con un incremento en la permeabilidad de la membrana celular, lo cual se sugiere representa el evento molecular primario que desencadena los síntomas de daño por frío (Sevillano y col 2009).

En la Figura 6 se muestran los valores para lixiviación de electrolitos de los tomates con y sin TH almacenados a temperatura de DF (5 °C) durante 20 días, así como después de un periodo de maduración de 7 días a 21 °C. Se puede observar que el porcentaje de electrolitos lixiviados fue significativamente (p<0.05) mayor para los frutos que no recibieron tratamiento hidrotérmico después de 20 días de almacenamiento a 5 °C, así como después del periodo de maduración. Esto concuerda con el mayor valor de IDF encontrado en el presente estudio para los frutos sin TH, sugiriendo que los daños críticos en la membrana celular que provocan la pérdida de su permeabilidad y dan lugar al desarrollo de los síntomas del DF ocurren durante el almacenamiento a temperaturas bajas y no pueden ser reparados completamente al transferirse a temperatura de maduración. Este mismo comportamiento fue observado por Cárdenas-Torres (2013) y Valenzuela-Ponce (2016) en tomates del mismo cultivar con y sin tratamiento hidrotérmico almacenados hasta por 20 días a 5 °C. Zhang y col (2013) y Cruz-Mendívil y col (2015) aplicaron tratamientos térmicos previo al almacenamiento en frío en tomate cv Messina (aire

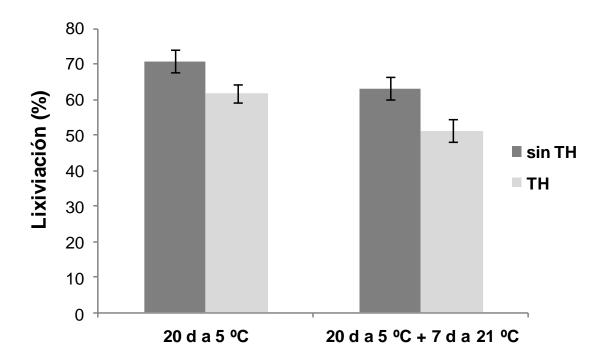


Figura 6. Lixiviación de electrolitos en frutos de tomate sin y con TH. Los frutos fueron almacenados por 20 días a 5 °C y posteriormente por 7 días a 21 °C. Las barras verticales indican LSD= 5.4269 para 20 días a 5 °C y LSD= 3.1045 para 20 días a 5 °C +7 días a 21 °C (α =0.05).

caliente, 38 °C por 12 h) y Micro-Tom (TH, 40 °C por 7 min), respectivamente, observando resultados similares a los del presente estudio. 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.

Los resultados de lixiviación de electrolitos sugieren que el tratamiento hidrotérmico brindó cierta tolerancia al DF a los frutos de tomate. La menor fuga de electrolitos en frutos con TH podría estar relacionada con una menor pérdida en la funcionalidad de las membranas celulares. Zhao y col (2009a) reportaron valores menores de lixiviación en tomates con cierta tolerancia al DF (Santiam) en comparación con frutos menos tolerantes (Linchun). En otro estudio desarrollado por Jing y col (2009) observaron que la aplicación de TH confirió a los frutos una mayor protección al daño de membranas, lo cual se tradujo en una menor lixiviación de electrolitos en estos frutos con respecto a los no tratados. Al mismo tiempo estos autores observaron que los frutos con TH presentaban un menor daño en los organelos del tejido de pericarpio como retículo endoplásmico, vacuolas y mitocondrias, encontrando incluso intactas las membranas de los dos últimos.

2 Contenido de malondialdehido (MDA)

El malondialdehido (MDA) ha sido ampliamente utilizado como un indicador del estrés oxidativo y del grado de daño ocurrido en las membranas celulares de frutos expuestos a estrés por frío, ya que es el producto final de la peroxidación de lípidos, el cual representa el evento primario responsable de la pérdida de la

integridad de las membranas celulares, cuya magnitud es dependiente del tiempo de exposición a temperaturas bajas (Hodges y col 1999; Zhang y col 2013).

En la Figura 7 se muestran los valores del contenido de MDA para los tomates almacenados a 5 °C, donde se puede observar una mayor peroxidación de lípidos en los frutos sin TH. Los resultados demuestran que la aplicación de un tratamiento hidrotérmico redujo significativamente el contenido de MDA en los frutos de tomate durante su almacenamiento a temperatura baja (5 °C), así como después del periodo de maduración (21 °C). El valor significativamente (p<0.05) mayor de MDA observado en los frutos sin TH podría ser consecuencia de un evento cascada provocado por las temperaturas bajas, el cual tiene su inicio con la reorganización de los lípidos de membrana, lo que podría provocar una mayor susceptibilidad por parte de los ácidos grasos a ser oxidados por la gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) proveniente de la activación de NADPH oxidasas localizadas en la membrana celular (Asada y col 1977; Vianello y Marci 1991; Ogawa y col 1997) y el escape de electrones de la cadena de transporte en mitocondrias y cloroplastos debido a alteraciones en la funcionalidad de sus membranas (Mittler 2002); aunado a esto, una mayor expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos (Cruz-Mendivil y col 2015) y un aumento en la actividad enzimática de lipoxigenasa (LOX) estarían aumentando el grado de peroxidación de los lípidos y provocando un mayor daño a la membrana celular. LOX es una enzima que desencadena la peroxidación de lípidos de la membrana plasmática disminuyendo el nivel de desaturación y la integridad de la misma (Lee y col 2005).

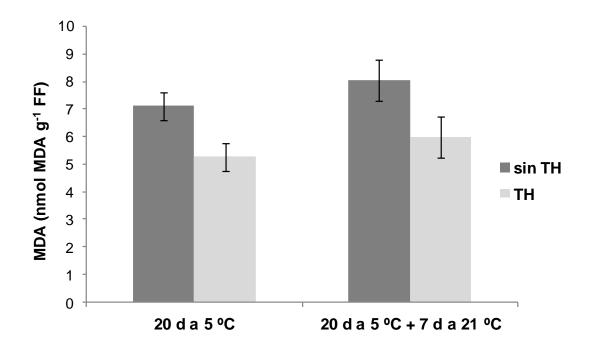


Figura 7. Contenido de malondialdehido (MDA) en frutos de tomate sin TH y con TH. Los frutos fueron almacenados durante 20 días a 5 °C y posteriormente por 7 días a 21 °C. Las barras verticales indican LSD= 1.0176 para 20 días a 5 °C y LSD= 1.480 para 20 días a 5 °C +7 días a 21 °C (α =0.05).

Respecto a los valores significativamente menores de MDA en los tomates con TH, esto podría estar relacionado con un incremento de ácidos grasos insaturados presentes en la membrana celular, con una mayor actividad enzimática de proteínas del sistema antioxidante como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) (Cárdenas-Torres 2013; Zhang y col 2013) y con una menor expresión de genes relacionados con el catabolismo de ácidos grasos (Cruz-Mendivil y col 2015).

La maduración es un proceso mediante el cual los frutos desarrollan los atributos de calidad deseables por los consumidores. Durante esta etapa se producen una gran cantidad de modificaciones químicas, físicas y estructurales como consecuencia de la inducción en la expresión de genes codificantes para proteínas con actividad enzimática encargadas de producir la textura, coloración, sabor y olor característico del fruto maduro. Una gran cantidad de estudios han mostrado la importancia del etileno durante la maduración de tomate, ya que está relacionado con la inducción de genes de maduración, entre ellos los involucrados con el metabolismo de la pared celular, lípidos y biosíntesis de carotenoides (Pirrello y col 2009). También se ha observado que el efecto de la maduración sobre parámetros fisiológicos como lixiviación de electrolitos es dependiente del cultivar analizado y que guarda una alta correlación positiva con la pérdida de agua, la cual es responsable de la pérdida de firmeza y peso del fruto (Parker y Maalekuu 2013). Esto podría explicar en cierto grado los valores de electrolitos lixiviados y MDA observados en los frutos de tomate después del periodo de maduración, ya que durante este proceso existe de manera natural una producción de ROS, además de

metabolitos secundarios que pudieran tener un efecto sobre la integridad y permeabilidad de las membranas. En un estudio realizado por Cárdenas-Torres (2013) en frutos de tomate cv Imperial con y sin TH, se observó que la pérdida de peso no representaba un síntoma importante de DF. Por su parte, Parker y Maalekuu (2013) observaron que el efecto de la maduración sobre la lixiviación de electrolitos era distinto en los diferentes cultivares de tomate, siendo en algunos casos superior en la etapa de madurez completamente roja respecto a las etapas anteriores y en otras ocasiones todo lo contrario. Respecto a MDA, Jiménez y col (2002) reportaron un incremento en la acumulación de lípidos y proteínas oxidadas durante la maduración del fruto (cv Alisa Craig) como consecuencia del H₂O₂ producido en las diferentes etapas de madurez. En otro estudio, Mondal y col (2004) observaron una mayor cantidad de lípidos peroxidados en frutos de tomate completamente rojos, lo cual asociaron con el aumento de la actividad enzimática de lipoxigenasa (LOX).

Los resultados para MDA concuerdan con lo obtenido para el IDF y lixiviación de electrolitos durante el periodo de almacenamiento en frío y el periodo de maduración. Esto era de esperarse ya que al haber una mayor peroxidación de lípidos existe una mayor perdida en la permeabilidad selectiva de las membranas, lo cual se refleja en un incremento en la fuga de electrolitos y severidad de los síntomas de DF. Este comportamiento concuerda con lo observado por Cárdenas-Torres (2013) y Valenzuela-Ponce (2016) para frutos de tomate del mismo cultivar tratados hidrotérmicamente, así como con lo reportado por Zhang y col (2013) para tomate cv Messina con tratamiento térmico almacenado a temperatura baja. En estos estudios

se demostró la importancia de la aplicación de un tratamiento térmico en la inducción de la tolerancia al DF, lo cual se ve reflejado en la reducción de los parámetros fisiológicos (lixiviación de electrolitos y MDA) y síntomas visuales de este desorden. En este sentido, Zhao y col (2009a) reportaron valores menores en la lixiviación de electrolitos y MDA para tomates que poseían cierta tolerancia al daño por frío (Santiam) respecto a un cultivar más sensible (Lichun) y lo relacionaron con la menor incidencia en los síntomas de DF presentes en el mismo. Los resultados del presente estudio concuerdan con los estudios anteriores y sugieren que la aplicación del TH brinda un efecto protector al fruto de tomate contra el DF, evidenciado por los valores menores de lixiviación de electrolitos, contenido de MDA y menores síntomas visuales en el fruto.

C CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON ESTRÉS POR BAJA TEMPERATURA Y TOLERANCIA INDUCIDA AL DAÑO POR FRÍO

En estudios previos se observó cierta tolerancia al daño por frío en frutos de tomate cv Imperial tratados hidrotérmicamente respecto a frutos sin tratar, lo cual fue relacionado con una mayor actividad enzimática de proteínas del sistema antioxidante (SOD, CAT y APX) (Cárdenas-Torres 2013) y con la acumulación diferencial de proteínas, destacando las relacionadas con el estrés térmico (HSP, sHSP), metabolismo de carbohidratos y obtención de energía (TPI, β-MPP, XI), el sistema antioxidante (TPX1, CuZn SOD, APX2) y la regulación en la expresión génica (GR-RBP) (Valenzuela-Ponce 2016). Al parecer, la eliminación del exceso de radicales libres, la regulación génica y la activación de proteínas tipo chaperona

forman parte de los principales mecanismos activados por la aplicación del TH que pudieran estar relacionados con la tolerancia al DF. Para comprender de mejor manera los mecanismos moleculares relacionados con la tolerancia al DF inducida por la aplicación de un tratamiento hidrotérmico en frutos del cultivar Imperial, en el presente estudio se evaluó la expresión transcripcional de genes que codifican para las proteínas anteriormente mencionadas y otros relacionados con la tolerancia al DF en frutos con y sin TH almacenados por 20 días a 5 °C y después de un periodo de maduración de 7 días a 21 °C. Este análisis se realizó mediante PCR en tiempo real y se determinaron niveles relativos de expresión con respecto al fruto sin TH utilizando el gen *UBI3* (Ubiquitina) como control para la normalización de los datos.

En la Figura 8 se muestra la expresión relativa de 12 genes evaluados en frutos con y sin TH después de 20 días de almacenamiento a 5 °C. Se puede observar una expresión mayor (p<0.05) de genes que codifican para proteínas relacionadas con respuesta al estrés térmico [proteína de choque térmico (HSP17.6)] y oxidativo [thioredoxin peroxidasa (TPX1), ascorbato peroxidasa (APX2) y glutatión-s-transferasa (GST)], biosíntesis de etileno [aminociclopropanocarboxilato oxilasa (ACO1); aminociclopropanocarboxilato sintasa (ACS4)] y carotenoides [fitoeno sintasa (PSY-1)], metabolismo de carbohidratos [xilosa isomerasa (XI)] y regulación en la expresión de genes [proteína rica en glicina de unión a ARN (GR-RBP)] en los frutos tratados hidrotérmicamente respecto a los no tratados. En cuanto a los frutos sin TH, estos presentaron una expresión mayor (p<0.05) de los genes que codifican para proteínas del metabolismo energético [triosa fosfato isomerasa (TPI)] y metabolismo de pared celular [poligalacturonasa (PG)].

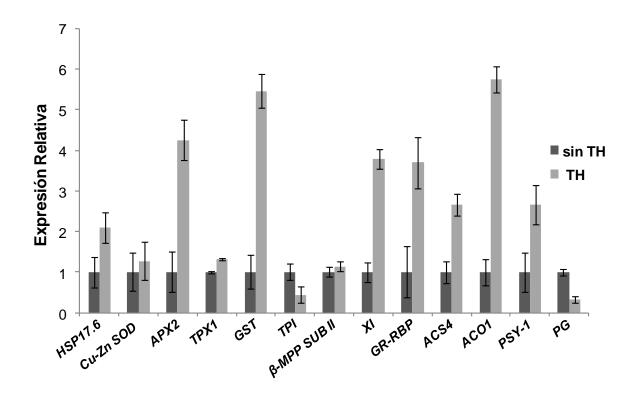


Figura 8. Expresión relativa de genes relacionados con susceptibilidad y tolerancia al DF en frutos de tomate cv Imperial con y sin tratamiento hidrotérmico almacenados por 20 días a 5 °C. La expresión de los genes se calculó utilizando al gen *UBI3* como control y tomando como referencia el fruto sin TH, cuyo nivel de expresión tomo el valor de 1. Las barras indican los LSD para gen. Proteína de choque térmico pequeña (*HSP17.6*), CuZn superoxido dismutasa (*Cu-ZnSOD*), ascorbarto peroxidasa 2 (*APX2*), thioredoxin peroxidasa 1 (*TPX1*), glutatión-s-transferasa (*GST*), triosa fosfato isomerasa (*TPI*), subunidad II del complejo citocromo c reductasa/ peptidasa de procesamiento mitocondrial (*β-MPP SUBII*), xilosa isomerasa (*XI*), proteína de unión al ARN rica en glicina (*GR-RBP*), ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa 4 (*ACS4*), ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa 1 (*ACO1*), fitoeno sintasa (*PSY-1*), poligalacturonasa (*PG*).

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 transcripcionales de los genes anteriormente mencionados en frutos de tomate sin y con TH después de su almacenamiento a temperaturas bajas (20 días a 5 °C) y un periodo de maduración de 7 días a 21 °C, ya que en este punto hubo un mayor desarrollo de síntomas causados por la exposición al frío de acuerdo con el índice de daño por frío (Figura 4). Los genes expresados diferencialmente correspondieron a aquellos que codifican para proteínas de choque térmico (HSP17.6) y enzimas antioxidantes (CuZn SOD, APX2, TPX1, GST), así como para enzimas relacionadas con la biosíntesis de etileno (ACO1, ACS4) y carotenoides (PSY-1), el metabolismo de carbohidratos (XI, β-MPP SUBII) y la regulación de expresión génica (GR-RBP) (Figura 9). El análisis y discusión de estos resultados se presenta en la siguiente sección.

1 Genes relacionados con respuesta al estrés

a Proteína de choque térmico (HSP17.6)

El gen *HSP17.6* codifica para una proteína de choque térmico de bajo peso molecular clase II que forma 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). Este grupo de proteínas (sHSP) son codificadas por seis familias de genes cuya expresión se relaciona con el compartimento celular donde son requeridas; las clases I y II codifican para proteínas citosólicas mientras

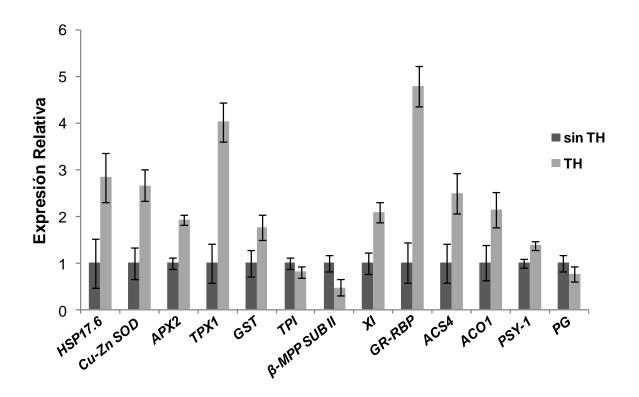


Figura 9. Expresión relativa de genes relacionados con susceptibilidad y tolerancia al DF en frutos de tomate cv Imperial con y sin tratamiento hidrotérmico almacenados por 20 días a 5 °C más 7 días a 21 °C. La expresión de los genes se calculó utilizando al gen *UBI3* como control y tomando como referencia el fruto sin TH, cuyo nivel de expresión tomo el valor de 1. Las barras indican los LSD de cada gen. Proteína de choque térmico pequeña (*HSP17.6*), superoxido dismutasa (*Cu-Zn SOD*), ascorbato peroxidasa (*APX2*), thioredoxin peroxidasa (*TPX1*), glutatión-stransferasa (*GST*), triosa fosfato isomerasa (*TPI*), subunidad II del complejo citocromo c reductasa/ peptidasa de procesamiento mitocondrial (*β-MPP SUB II*), xilosa isomerasa (*XI*), proteína de unión al ARN rica en glicina (*GR-RBP*), ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa 4 (*ACS4*), ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa 1 (*ACO1*), fitueno sintasa (*PSY-1*), poligalacturonasa (*PG*).

que las clases III y IV para proteínas localizadas en el cloroplasto y retículo endosplasmático (Vierling 1991; Helm y col 1993). La quinta clase codifica para sHSP ubicadas en mitocondria (Lenne y Douce 1994; Dong y Dunstan 1996) y por último, la sexta clase, la cual está representada particularmente por la proteína de 22.3 KDa encontrada en soya, su ubicación se cree es en el retículo endosplasmático (LaFayette y col 1996). Como se esperaba, el nivel de expresión de este gen fue significativamente (P<0.05) mayor en los frutos sometidos al TH con respecto a los no tratados, tanto al día 20 de almacenamiento en frío (Figura 8), como después del periodo de maduración de 7 días a 21 °C (Figura 9). Esto coincide con estudios previos donde se ha reportado que temperaturas moderadamente altas inducen la expresión génica y síntesis de proteínas de choque térmico de bajo peso molecular en frutos de tomate (Sabehat y col 1996; Kadyrzhanova y col 1998; Polenta y col 2007; Cruz-Mendivil y col 2015), las cuales podrían estar contribuyendo en la adquisición de termotolerancia por parte de los frutos, ya que se ha encontrado una correlación entre la acumulación de estas proteínas y la tolerancia al DF presentada por los frutos sometidos a un tratamiento térmico (Sabehat y col 1996; Polenta y col 2007). Además, Süle y col (2004) sugieren que el acondicionamiento de los frutos a temperaturas altas incrementa la abundancia de proteínas de bajo peso molecular, las cuales entre sus funciones destaca el actuar como chaperonas moleculares ayudando al plegamiento correcto, renaturalización y evitando la precipitación de proteínas bajo condiciones de estrés (Wang y col 2004). Löw y col (2000) reportaron actividad chaperona in vivo para las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP17.7 clase I y 7 sHSP 17.3 clase II) en tomate cv Harzfeuer, proponiendo que estas actúan en conjunto con las proteínas de choque térmico de alto peso molecular en la renaturalización o plegamiento correcto de las proteínas. Estos autores sugieren que las sHSP representan el primer paso en este proceso, funcionando como estabilizadores de las proteínas al producirse la unión sHSP-Proteína no plegada, la cual representa solo un intermediario ya que son las proteínas de choque térmico de alto peso molecular dependientes de ATP las encargadas del plegamiento correcto de las proteínas.

Kadyrzhanova y col (1998) reportaron un mayor nivel de expresión del gen HTC1 (tolerancia al daño por frío inducida por calor) que codifica para una proteína de choque térmico de bajo peso molecular (HSP17.6 clase II) en frutos de tomate cv Mountain Springs sometidos a un tratamiento térmico (42 °C por 2 días) en comparación con frutos no tratados y almacenados a temperatura de daño por frío (2 °C). Algo similar fue reportado por Ding y col (2001) guienes encontraron una mayor expresión de genes que codifican para proteínas de choque térmico de bajo (sHSP17.7; sHSP17.6) y alto (HSP70-1; HSP70-3) peso molecular en frutos tratados con metil jasmonato, metil silicato o térmicamente (38 °C por 2 días) durante todo su almacenamiento en frío (1, 3, 7, 14, 21, y 28 días a 5 °C); además correlacionaron la expresión del gen que codifica para sHSP17.7 con la tolerancia inducida al DF mediante la aplicación de los diferentes tratamientos. Recientemente, Cruz-Mendivil y col (2015) reportaron una mayor expresión de genes que codifican para proteínas de choque térmico de bajo (clase I, II y IV) y alto peso molecular (HSP70 y HSP90) en frutos de tomate Micro-Tom tratados hidrotérmicamente y almacenados por 14 días a temperatura de daño por frío (5 °C). Esto coincide con lo encontrado en el presente estudio donde se observó una mayor expresión del gen que codifica para la proteína sHSP17.6 clase II en los tomates con TH al término del almacenamiento en frío (Figura 8), sugiriendo que esta puede estar jugando un papel muy importante en la tolerancia adquirida por el fruto al DF. Interesantemente, Valenzuela-Ponce (2016) reportó una acumulación significativamente mayor de esta proteína después de 20 días a 5 °C en frutos de tomate del mismo cultivar tratados hidrotérmicamente en comparación con los no tratados. Esto confirma junto con otras investigaciones que la acumulación de proteínas pertenecientes a esta familia es clave como primera respuesta del tomate para hacer frente al DF (Sánchez-Bel y col 2012).

En lo que respecta a la expresión después del periodo de maduración (7 días a 21 °C), la expresión relativa de *HSP17.6* fue significativamente (P<0.05) más alta en los frutos con TH respecto a los no tratados (Figura 9), con un valor mayor al observado al término del periodo de almacenamiento a 5 °C (Fig 8). Este resultado concuerda con lo reportado por Valenzuela-Ponce (2016) quien observó una mayor acumulación de proteínas de choque térmico de bajo (sHSP17.6 clase II) y alto (HSP60) peso molecular en frutos de tomate cv Imperial después del periodo de maduración de 7 días a 21 °C. Por otro lado, Ding y col (2001) reportaron un aumento en el nivel de transcritos para esta proteína en el estado cambiante durante la maduración de frutos de tomate cv Beefstake sin ningún tratamiento. La expresión génica observada en el presente estudio, así como la mayor acumulación de proteínas reportada por Valenzuela-Ponce (2016) en frutos de tomate cv Imperial sugiere que las proteínas de choque térmico podrían estar contribuyendo a la mitigación del DF y a la maduración normal del fruto. 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.

b Superóxido dismutasa (SOD)

La enzima superóxido dismutasa constituye la primer línea de defensa contra las especies reactivas de oxígeno producidas bajo condiciones normales o de estrés a las cuales la planta es sometida (Alscher y col 2002). SOD forma parte del sistema enzimático antioxidante y cataliza la reducción de los radicales superóxido (O2-) a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. El anión O² puede producirse en cualquier compartimento de la célula donde exista una cadena de transporte de electrones incluyendo microsomas, glioxisomas, apoplastos, citosol, mitocondria, cloroplastos y peroxisomas (Elstner 1991), siendo los tres últimos compartimentos los responsables de la mayor generación de ROS en la célula (Fridovich 1986). Por esta razón, SOD es clave para la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y es crucial su presencia en los diferentes compartimentos de la célula (Gómez y col 1999). Se ha reportado la existencia de tres clases de SOD, las cuales están codificadas por diferentes genes y difieren tanto en su ubicación dentro de la célula como en el cofactor utilizado para la reducción del anión superóxido; Fe SOD se localiza en cloroplastos, mientras que Mn SOD se encuentra asociada a membrana en mitocondria y peroxisomas, y CuZn SOD en cloroplastos, citosol y posiblemente en el espacio extracelular (Alscher y col 2002).

Solamente se encontraron diferencias significativas (P<0.05) en la expresión del gen CuZnSOD que codifica para la enzima superoxido dismutasa dependiente de cobre y zinc después del periodo de maduración de 7 días a 21 °C, siendo mayor en los frutos de tomate tratados hidrotérmicamente respecto a los frutos sin TH (Figura 8). El aumento en el nivel de transcritos puede estar relacionado con una mayor acumulación y actividad enzimática de la proteína CuZn SOD, disminuyendo con ello los ROS generados durante la maduración del fruto que podrían potencializar la pérdida de la integridad de la membrana celular e inducir mayores síntomas de 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 detoxificación del O2- debido a la menor expresión del gen CuZn SOD. Los resultados del presente estudio concuerdan con lo reportado por Valenzuela-Ponce (2016) quien observó una mayor acumulación de la proteína CuZn SOD en frutos de tomate cv Imperial tratados hidrotérmicamente y sometidos a un almacenamiento de 20 días a 5 °C más un periodo de maduración de 7 días a 21 °C. Debido a que los frutos con TH presentaron mayor tolerancia al DF, se sugirió que la mayor acumulación de la proteína pudiera ser clave en la protección contra el estrés oxidativo y el daño a membranas celulares que dan a lugar a los síntomas visibles de DF.

Los valores similares de expresión del gen *CuZn SOD* en los frutos con y sin TH al término del almacenamiento a bajas temperaturas (20 días a 5 °C) (Figura 9) coinciden con lo reportado por Valenzuela-Ponce (2016), quien no observó diferencias en acumulación de la proteína CuZn SOD en frutos de tomate cv Imperial

tratados y almacenados bajo las mismas condiciones. Estos resultados indican que el TH no tiene efecto sobre la acumulación de transcritos y proteína de SOD durante el almacenamiento en frío, lo cual sugiere que los niveles normales de la proteína proporcionan una actividad de SOD suficiente para detoxificar el anión superóxido producido por el estrés por bajas temperaturas, mientras que durante la maduración se requiere una mayor acumulación de la enzima para garantizar dicha detoxificación y prevenir los síntomas de DF. Sin embargo, Cárdenas-Torres (2013) observó una mayor actividad enzimática de esta proteína en frutos de tomate cv Imperial con TH después de ser almacenados por 10 y 15 días a 5 °C, mientras que Zhang y col (2013) reportaron un incremento gradual en la actividad de SOD durante el almacenamiento a temperaturas de DF (7, 14, 21 y 28 d a 2 °C) en frutos de tomate cv Messina sometidos a un tratamiento con aire caliente. Ambos estudios sugirieron un papel clave de esta enzima en la detoxificación del anión superóxido producido durante esta condición de estrés y que pudiera estar contribuyendo al desarrollo de los síntomas de DF. Debido a que la mayor actividad de la enzima en respuesta al TH no se relaciona con una mayor expresión a nivel transcripcional o traduccional, es posible que dicha activación se relacione con una mayor estabilidad y funcionalidad de la proteína proporcionada por las proteínas de choque térmico.

c Ascorbato peroxidasa (APX2)

Los genes de *APX* en tomate forman parte de una familia cuya expresión es dependiente del tipo de estrés al que el tejido de la planta o fruto es expuesto; *APX1*, *APX2* y *APX3* son genes que codifican para enzimas ascorbato peroxidasas localizadas en citosol, expresados principalmente en raíz (*APX1*, *APX2*), tallo y fruto

(*APX2*, *APX3*), mientras que *APX4* y *APX5* son genes peroxisomales expresados en hojas, tallo (*APX4*, *APX5*) y fruto (*APX5*) de tomate. Por último, *APX6* y *APX7* son genes cloroplásticos que codifican para enzimas localizadas en estroma y tilacoide, cuya expresión principalmente ocurre en hojas (*APX6*), raíz, tallo y fruto (*APX7*) de tomate. Se ha sugerido que el producto del gen *APX7* posee una función doble al ser dirigido tanto al estroma de los cloroplastos como a la matriz mitocondrial (Najami y col 2008).

Ascorbato peroxidasa es una enzima del sistema antioxidante que pertenece al ciclo ácido ascórbico-glutation (AsA-GSH) localizado en el estroma de cloroplastos y citosol. Su función es detoxificar el H₂O₂ mediante su reducción a H₂O utilizando como donador de electrones al ácido ascórbico. El monodehidroascorbato generado por la oxidación del AsA puede ser reducido directamente por la enzima monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) que utiliza NADPH agente reductor o puede oxidarse de nuevo para producir dehidroascorbato, el cual es reducido a AsA por la enzima dehidroascorbato reductasa dependiente de glutatión (GSH). Por último el glutatión oxidado es regenerado por el NADPH a través de la enzima glutatión reductasa (GR).

En una gran cantidad de investigaciones se ha estudiado la importancia de la enzima APX en el control del H_2O_2 producido por condiciones de estrés. En todos ellos se muestra que APX es una enzima esencial en el proceso de señalización intracelular mediado por especies reactivas de oxígeno, así como en la prevención del daño a tejidos provocado por el estrés oxidativo en organismos fotosintéticos (Shigeoka y col 2002). En el presente estudio se observó una mayor (P<0.05)

expresión del gen *APX2* en frutos de tomate cv Imperial tratados hidrotérmicamente respecto a frutos sin tratamiento a los 20 días de almacenamiento a 5 °C (Figura 8); sin embargo, Valenzuela-Ponce (2016) no encontró diferencias en acumulación de esta proteína en el mismo cultivar con TH y almacenado bajo las mismas condiciones. Esta diferencia podría estar relacionada con el hecho de que no todo el ARNm es traducido, quizás porque la actividad enzimática de la proteína es suficiente para detoxificar el H₂O₂ generado por el estrés por frío. Sin embargo, Cárdenas-Torres (2013) reportó un incremento en la actividad enzimática de APX a los 15 días de almacenamiento a 5 °C en frutos de tomate del mismo cultivar tratados hidrotérmicamente. Al igual que en el caso de SOD, es probable que la mayor actividad de APX obedezca a la acción de las proteínas de choque térmico.

La expresión de los genes *APX* representa una respuesta natural del fruto de tomate al estrés por bajas temperaturas debido a la necesidad de disminuir los niveles de ROS producidos en los diferentes compartimentos de la célula (Tsaniklidis y col 2014). Al parecer la aplicación de un tratamiento hidrotérmico indujo una mayor expresión del gen *APX* en frutos almacenados a temperatura baja (20 días a 5 °C), por lo que es posible que exista una reducción más eficaz de las especies reactivas de oxígeno y una menor peroxidación de lípidos de membrana, proporcionando al fruto una mayor tolerancia al DF. Ioannidi y col (2009) reportaron la inducción en la expresión de un gen que codifica para una APX cloroplástica en frutos de tomate cv Ailsa Craig, al poco tiempo (1 h) de someterlo a un tratamiento térmico (48 h a 40 °C) como un mecanismo de defensa a una posible sobreproducción de ROS. En otro estudio, Mittova y col (2004) asociaron la mayor acumulación y actividad enzimática

de APX mitocondrial de un cultivar tolerante al estrés salino con una disminución en la cantidad de lípidos peroxidados (MDA) en mitocondria. Estos autores sugirieron que las diferentes isoformas de APX (unida a membrana y soluble en matriz mitocondrial) son clave para la protección de la membrana celular ya que ayudan a la detoxificación del H₂O₂ producido por la acción de Mn SOD unida a membrana. Por su parte, Najami y col (2008) reportaron una mayor expresión génica de *APX*s citosólicos en un cultivar tolerante a altas concentraciones salinas (*S. lycopersicum* cv. M82) respecto al cultivar sensible (*S. pennellii* acc. Atico).

En lo que respecta a la expresión del gen APX2 después del periodo de maduración, esta fue significativamente (P<0.05) mayor en los frutos de tomate que recibieron tratamiento hidrotérmico (Figura 9), lo cual coincide con la mayor acumulación de la proteína ascorbato peroxidasa reportada por Valenzuela-Ponce (2016) para frutos de tomate cv Imperial con TH expuestos a las mismas condiciones (20 días a 5 °C más 7 días a 21 °C). La correspondencia entre la mayor expresión del gen APX2 del presente estudio con la mayor acumulación de proteína reportada previamente sugiere que ascorbato peroxidasa representa uno de los primeros mecanismos de eliminación del H₂O₂ producido por superóxido dismutasa en los diferentes compartimentos de la célula. Ioannidi y col (2009) reportaron niveles altos de transcritos para APX y diferentes isoformas de SOD durante el desarrollo y maduración del fruto de tomate cv Ailsa Craig, principalmente en las primeras y últimas etapas de madurez. Los resultados del presente estudio sugieren que la mayor expresión génica se podría ver reflejada en una mayor actividad enzimática que podría ser clave en la eliminación del H₂O₂ producido durante la maduración y que de no eliminarse podría potencializar la peroxidación de lípidos y pérdida de la integridad de la membrana celular, provocando mayor incidencia de síntomas de DF.

d Tioredoxin peroxidasa 1 (TPX1)

Las tioredoxina peroxidasas (TPXs) son miembros de la familia de enzimas antioxidantes peroxirredoxinas (PRX), las cuales se encuentran clasificadas en cuatro grupos (PRX 2-cys, PRX 1-cys, PRX tipo II y PRX Q) debido a sus diferencias en secuencia (en el número y posición del aminoácido Cys) y mecanismos catalíticos utilizados para la reducción del peróxido. La reacción de reducción es catalizada por el grupo sulfhidrilo (-SH) presente en el aminoácido Cys localizado en la porción Nterminal de la proteína, mientras que la reducción del enlace disulfuro (S-S) producido por la oxidación del grupo sulfhidrilo (-SH) es diferente en los cuatro grupos de peroxirredoxinas; para PRX 2-cys el grupo sulfhidrilo es oxidado dando lugar a la formación de un enlace disulfuro intermolecular con una Cys de otra subunidad, mientras que para PRX Q el enlace disulfuro se produce con una Cys de la misma subunidad formando un enlace intramolecular, en ambos casos los enlaces disulfuro son reducidos vía sistema thioredoxina (Rouhier y Jacquot 2002). Para el caso de los otros dos grupos de peroxirredoxinas (PRX 1-cys y PRX tipo II) el grupo -SH es oxidado sin la producción de un enlace disulfuro, ya que probablemente no existe otro residuo de cisteína involucrado en la catálisis. La principal diferencia entre estas dos clases es que las PRXs tipo II son reducidas a partir de glutaredoxina (Grx) o el sistema thioredoxina (Rouhier y col 2001; Brehelin y col 2003; Finkemeier y col 2005), mientras que PRX 1-Cys al parecer es reducido solo por el sistema thioredoxina (Pedrajas y col 2000).

El gen tioredoxina peroxidasa 1 (TPX1) codifica para la enzima TPX1 perteneciente al grupo Prx 2-cys involucrada en la detoxificación de H₂O₂ e hidroperoxidos de alquilo (Jin y col 1997) a través del sistema tioredoxina (Ross y col 2000). La detoxificación a través de este sistema consiste en la neutralización del H₂O₂ 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). La expresión de este gen a los 20 días de almacenamiento a 5 °C fue significativamente (P<0.05) mayor en los frutos tratados hidrotérmicamente respecto a los frutos sin TH (Figura 8), lo que coincide con la mayor acumulación de la proteína TPX1 reportada por Valenzuela-Ponce (2016) en tomate cv Imperial con TH almacenado por 20 días a 5 °C y por Vega-García y col (2010) en tejido de tomate sano del mismo cultivar expuesto a temperatura de daño por frío, sugiriendo que esta enzima es necesaria para proteger el tejido del estrés oxidativo provocado por las bajas temperaturas. Interesantemente, Cheng y col (2016) reportaron la inducción de la expresión de dos genes para PRX 2-cys en hojas de tomate cv Condine Red como respuesta al estrés térmico (45°C por 7 horas). Por otro lado, Baier y Dietz (1997) reportaron una PRX 2-cys cloroplástica en cebada formando parte del sistema de defensa antioxidante y protegiendo a la membrana fotosintética del daño oxidativo, mediante la reducción del H₂O₂ e hidroperóxidos de alquilo a sus respectivos productos (H₂O y alcoholes). En Arabidopsis thaliana, la supresión antisentido de una PRX 2-cys afectó la estructura y función de los cloroplastos, particularmente a las proteínas D1 del centro de reacción

del PSII, Rubisco, el complejo captador de luz asociado al PSII (LHCII) y al factor acoplado a la ATP sintasa tilacoidal (CF1) durante las etapas tempranas del desarrollo de las hojas (Baier y Dietz 1999). En este mismo sentido, Awad y col (2015) reportaron una disminución en la eficiencia fotosintética, así como niveles elevados del anión superoxido, H₂O₂ y proteínas carboniladas en mutantes de *Arabidopsis thaliana* que poseían la represión de dos genes de TPXs 2-cys. Por otra parte, Do y col (2003) reportaron la sobreexpresión de un gen para una TPX (*CAPOT1*) en chile en respuesta al tratamiento con H₂O₂ y la inoculación con la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatora*, mientras que Sakamoto y col (2003) demostraron la habilidad de una TPX citosólica (TPxIc) de *Arabidopsis* para proteger contra el estrés inducido por H₂O₂ y NO.

Los frutos con TH también presentaron una expresión significativamente (P<0.05) mayor del gen *TPX1* después del periodo de maduración a 21 °C (Figura 9). Diversos estudios han identificado la proteína TPX en frutos de tomate durante diferentes procesos como la pudrición apical, la aclimatación a bajas temperaturas y la maduración, sin embargo existe muy poca información acerca del posible papel que desempeñan durante el proceso de maduración del fruto. Recientemente Valenzuela-Ponce (2016) no encontró diferencias significativas en cuanto a la acumulación de la proteína TPX1 en tomate cv Imperial después del almacenamiento a temperatura de DF (20 días a 5 °C) y un periodo de maduración de 7 días a 21 °C, por lo que la mayor expresión génica del gen no parece reflejarse en una mayor acumulación de la proteína. Es necesario ampliar el conocimiento acerca de las funciones que posee esta enzima durante el proceso de maduración para tener un

panorama más amplio de los mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia al DF y en la maduración normal del fruto.

e Glutation-s-transferasa (GST)

La enzima glutation-s-transferasa pertenece a una antigua superfamilia de proteínas catalíticas y de unión altamente distribuidas en diversos organismos aerobios; su presencia ha sido asociada con tolerancia a diversos tipos de estrés ya que es inducida por estrés biótico y abiótico, incluyendo la exposición a productos tóxicos, el estrés ambiental y enfermedades (Frova 2003). En plantas, las GSTs están involucradas en la detoxificación de xenobióticos y peróxidos de lípidos tóxicos, en la reducción de dehidroascorbato y metabolismo de metabolitos secundarios como los derivados de flavonoides e isoflavonoides (medicarpina) (Marrs 1996), así como en el transporte de antocianinas hacia la vacuola celular (Kitamura y col 2004), el mecanismo de señalización en respuesta a luz UV (Loyall y col 2000) y durante el desarrollo y crecimiento de la planta al ser inducida por auxina, etileno, ácido abscisico, jasmónico y salicílico (Marrs 1996; Moons 2005; Jiang y col 2010). La eliminación del exceso de ROS parece ser otra función catalizada por la enzima glutatión-s-transferasa debido a la capacidad peroxidasa dependiente de GSH que posee (GPOX) (Frova 2003); GSH se une al sitio-G localizado cerca del extremo Nterminal y GST promueve el moviemiento de protones del grupo sulfhidrilo de GSH al residuo de serina localizado en el centro activo, los cuales son utilizados para la isomerización o peroxidación del co-sustrato unido al sitio-H ubicado adyacente al sitio-G (Csiszár y col 2014).

La expresión del gen GST fue significativamente (P<0.05) mayor en los frutos tratados hidrotérmicamente respecto a los no tratados al término del almacenamiento a temperatura de DF (Figura 8), así como después del periodo de maduración (7 días a 21 °C) (Figura 9). Esta diferencia en expresión podría estar relacionada con una mayor capacidad de eliminar el exceso de especies reactivas de oxígeno y moléculas tóxicas procedentes de la peroxidación de lípidos, así como mantener el balance de moléculas antioxidantes (ácido ascórbico, α-tocoferol, antocianinas) mediante la actividad peroxidasa dependiente de GSH, que en conjunto podrían estar contribuyendo a la tolerancia al DF de los frutos con TH. Cruz-Mendívil y col (2015) reportaron que dentro de los mecanismos moleculares involucrados con la tolerancia al daño por frío producido por la aplicación de un tratamiento hidrotérmico se encuentra la sobreexpresión de genes que codificaban para enzimas glutatión-stransferasas. Por su parte, Xu y col (2015) reportaron la inducción del gen LeGSTU2 en planta y fruto de tomate por la exposición a diferentes condiciones de estrés, entre ellas térmico. Además observaron que la sobreexpresión de este gen resultaba en una mayor actividad enzimática de la proteína y una mayor resistencia al estrés salino y osmótico por parte de plantas de Arabidopsis transformadas con el gen LeGSTU2.

Se ha sugerido que las enzimas GSTs son muy importantes en la adaptación y tolerancia de plantas a diferentes tipos de estrés, debido a las diferentes isoformas existentes y a su capacidad de detoxificar una gran cantidad de metabolitos tóxicos producidos durante su aclimatación. Sun y col (2010) reportaron una mayor expresión de genes que codifican para GSTs en plantas de tomate tolerante al estrés

salino (*Solanum pimpinellifolium*, 'PI365967') respecto a uno sensible (*Solanum lycopersicum*, 'Moneymaker'), mientras que Csiszár y col (2014) reportaron una mayor expresión de genes que codifican para glutatión-s-transferasas relacionadas con la detoxificación de xenobioticos, hidroperóxidos, metabolitos tóxicos, la isomerización de maleilacetoacetato a tirosina y reducción de compuestos antioxidantes en plantas de tomate expuestas a un tratamiento con ácido salicílico y estrés salino. En frutos de tomate, Sánchez-Bel y col (2012) reportaron la acumulación de la proteína GST en respuesta al estrés provocado por las bajas temperaturas (2 °C), por lo que sugirieron que esta proteína junto con proteínas de choque térmico formaban parte del mecanismo de tolerancia al estrés por frío.

2 Genes relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y energético a Triosa fosfato isomerasa (*TPI*)

El gen *TPI* codifica para la enzima triosa fosfato isomerasa (TPI) que cataliza la isomerización entre dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato y es esencial en la ruta de glicólisis. 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). Las plantas poseen dos isoformas de la enzima TPI localizadas en citosol y plástidos, las cuales están codificadas por genes nucleares independientes; la TPI citosólica actúa principalmente en el proceso de la glucólisis y gluconeogénesis mientras que TPI de plástido además de participar en las mismas

rutas tiene un papel muy importante durante la fotosíntesis (Pichersky y Gottlieb 1984).

La expresión del gen TPI fue significativamente (P<0.05) mayor en los frutos sin TH respecto a los tratados hidrotérmiamente al día 20 de almacenamiento a temperatura de DF (5 °C) (Figura 8). Interesantemente, Valenzuela-Ponce (2016) reportó un incremento en la acumulación de la proteína TPI en frutos de tomate cv Imperial que no recibieron tratamiento hidrotérmico durante todo el periodo de almacenamiento a bajas temperaturas, observando la mayor acumulación al término de este periodo (20 días). Además, sugirió que de manera general la enzima responde al estrés por bajas temperaturas y que su acumulación podría ser una respuesta celular para tratar de proteger los tejidos del estrés por frío. En otro estudio realizado en el mismo cultivar almacenado a temperatura de DF (5 °C) y refrigeración (12 °C), se encontró que el incremento en la acumulación de TPI ocurrió entre los 15 y 25 días de almacenamiento a temperatura de daño por frío (Vega-García y col 2010). Ambos reportes concuerdan con lo observado en el presente estudio, sugiriendo que la mayor expresión del gen TPI en frutos sin TH está fuertemente relacionada con la mayor acumulación de proteína, posiblemente por una mayor necesidad energética consecuencia del reemplazo de moléculas oxidadas y el restablecimiento de la homeóstasis celular. Por otro lado, Malacrida y col (2006) reportaron un incremento en la tasa de respiración para frutos de tomate Micro-Tom sometido durante 28 días a temperaturas de DF (4 °C) respecto a frutos almacenados a temperatura de no daño. El incremento en la respiración podría estar asociado con la mayor expresión génica y acumulación de la proteína TPI como

consecuencia de una eficiencia baja en la producción de energía debido a la perturbación de la homeóstasis celular.

El incremento en la acumulación de la proteína TPI bajo diferentes condiciones de estrés ha sido reportado previamente en tomate. Zhou y col (2011) analizaron los cambios en el proteoma de hoja y raíz de tomate expuesta a altas concentraciones salinas, observando la sobreacumulación de algunas proteínas pertenecientes al metabolismo de carbohidratos entre ellas triosa fosfato isomerasa, enolasa y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD. En otro estudio y con la finalidad de comprender los cambios moleculares asociados al estrés por frío, Weiss y Egea-Cortines (2009) analizaron los cambios transcriptómicos en tomate Micro-Tom ocasionados por la exposición a bajas temperaturas. Entre los resultados obtenidos encontraron la inducción principalmente de genes relacionados con el transporte de electrones en mitocondria y cloroplasto, la biosíntesis de proteínas y el metabolismo de carbohidratos y producción de energía, entre ellos encontraron la inducción del gen que codifica para la enzima TPI.

Diversos estudios han reportado una disminución en la acumulación y actividad enzimática de triosa fosfato isomerasa durante las últimas etapas de maduración en el fruto de tomate. Biais y col (2014) al analizar la acumulación de metabolitos claves y actividad enzimática de proteínas pertenecientes a las principales rutas metabólicas durante la maduración de frutos de tomate, observaron en general una disminución en la actividad enzimática de proteínas del metabolismo de carbohidratos como triosa fosfato isomerasa conforme la maduración avanzaba en el fruto, reportando el menor valor seis días después de que el fruto alcanzara su

madurez completa (rojo). Esto concuerda con la disminución en la tasa de respiración mostrada por los frutos climatéricos al alcanzar su madurez completa; el tomate no es la excepción, existen diversos estudios realizados en diferentes cultivares de tomate donde se ha observado una reducción en la velocidad de respiración al pasar del estado de madurez rosa a completamente rojo (Clendenning 1942; Chalmers y Rowan 1971). Esto podría explicar los valores muy similares en el nivel de transcritos observados en los frutos de ambos tratamientos después del periodo de maduración, ya que una vez madurado completamente la velocidad de respiración disminuye junto con la necesidad energética.

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).

b Subunidad II del complejo citocromo c reductasa/peptidasa de procesamiento mitocondrial (β-ΜΜΡ)

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 (β -MPP y α -MPP) (Glaser y Dessi 1999). En diversos estudios se ha comparado la secuencia aminoacídica de las proteínas centrales I y II del complejo citocromo c reductasa mitocondrial con las subunidades del complejo peptidasa de procesamiento mitocondrial alfa (α -MPP) y beta (β -MPP) presente en diferentes especies con el fin de investigar las posibles funciones desempeñadas en dicho complejo. En la mayoría de ellos se ha observado una amplia homología indicando que la función péptidasa está presente en el complejo y que podría estar desempeñando una función clave en el procesamiento de proteínas dirigidas hacia la mitocondria (Gakh y col 2002).

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).

El nivel de expresión del gen que codifica para la proteína de la subunidad II del complejo citocromo c reductasa/ peptidasa de procesamiento mitocondrial fue similar en los frutos con y sin TH al día 20 de almacenamiento a 5 °C (Figura 8). Esto difiere de lo reportado por Valenzuela-Ponce (2016) quien encontró una mayor acumulación de la proteína β-MPP en frutos de tomate cv Imperial sin TH después de su almacenamiento en frío (20 días a 5 °C) y por lo reportado por Vega-García y col (2010) quienes al analizar las diferencias en cuanto acumulación de proteínas en tejido de tomate sano y tejido dañado por frío, observaron una mayor acumulación de esta proteína en tejido que presentaban los síntomas de daño por frío. Ambos autores sugirieron que dicha acumulación podría estar asociada con una mayor 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. Esta diferencia pudiera deberse al corto ciclo de vida que posee el ARNm en comparación con la proteína, por lo que posiblemente el ARNm es degradado poco tiempo después de sintetizado, mientras que la proteína al ser mas estable se podría estar acumulando con el transcurrir de los días de almacenamiento sin necesidad de inducir una mayor expresión del gen.

Por otro lado, la expresión significativamente (P<0.05) mayor del gen β -MPP en los frutos sin TH respecto a los frutos tratados al término del periodo de maduración (7 días a 21 °C) corresponde con el mayor daño por frío observado en el fruto una vez transcurrido el almacenamiento a 21 °C, ya que la perdida de la integridad de la membrana celular de mitocondrias ha sido reportada en frutos de

tomate como una consecuencia de la exposición a temperaturas de daño por frío (Jing y col 2009). El complejo citocromo c reductasa mitocondrial al localizarse en el interior de la membrana mitocondrial podría estar siendo afectada por las bajas temperaturas induciendo una mayor expresión del gen para tratar de remplazar la proteína dañada y mantener su actividad.

c Xilosa isomerasa (XI)

Otro gen expresado diferencialmente es el que codifica para la enzima xilosa isomerasa, la cual participa en el metabolismo de carbohidratos y particularmente en la ruta de las pentosas fosfato; cataliza la reacción de isomerización de D-xilosa a D-xilusa. La D-xilosa es un monosacarido natural en plantas, se encuentra formando parte del polímero xilano y su incremento normalmente está relacionado con el metabolismo de la pared celular (Marondedze y col 2014; UniProt 2016).

Se observó una mayor expresión del gen XI en frutos con TH después del almacenamiento a temperatura de DF (Figura 8) y periodo de maduración (Figura 9), lo cual concuerda con la mayor acumulación de la proteína observada en frutos del mismo cultivar y que recibieron TH (Valenzuela-Ponce 2016). Esto puede ser parte de una mejor respuesta de los frutos con TH a una posible acumulación del metabolito xilosa resultado de la exposición a temperaturas bajas y su posterior maduración (Almeida y Huber 2008; Barka y col 2000). Además, podría estar relacionado con la mayor expresión de los genes que codifican para proteínas antioxidantes (SOD, APX, GST, TPX) observada en el presente estudio mediante la activación de la ruta metabólica de las pentosas fosfato, fuente principal de equivalentes reductores (NADPH) necesarios para las reacciones de biosíntesis y

regeneración del 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 a mantener la función de las proteínas e integridad de las membranas celulares.

Las modificaciones de la pared celular que resultan en cambios de firmeza son normales durante la maduración del fruto de tomate y exposición a diferentes tipos de estrés: dichas modificaciones producen una gran cantidad de metabolitos que funcionan como sustratos de diversas enzimas. A este respecto, Almeida y Huber (2008) al analizar el proceso de solubilización de pectinas en frutos de tomate durante el almacenamiento en frío (14 días a 5 °C) y posterior maduración (6 días a 15 °C), observaron cambios en la concentración de diversos azúcares como ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa. En el caso particular de xilosa, el estrés por frío resultó en un incremento de este azúcar al término del almacenamiento a bajas temperaturas y después de su maduración. Los resultados del presente estudio podrían ser consecuencia de modificaciones en la pared celular, que resultan en un incremento en la acumulación del azúcar xilosa, el cual es sustrato de la enzima xilosa isomerasa, cuya actividad podría conducir a un nivel más alto del agente reductor NADPH, indispensable para la regeneración de moléculas antioxidantes, como ácido ascórbico, tioredoxina y glutation.

3 Genes relacionados con regulación en la expresión génica

a Proteína rica en glicina (GR-RBP)

El gen *GR-RBP* codifica para la proteína de unión al ARN rica en glicina (GR-BP), cuya presencia en plantas ha sido relacionada con diversos procesos, entre ellos tolerancia al estrés y adaptación a bajas temperaturas (Kwak y col 2005; Kim y col 2005; Kim y col 2007a; Kim y col 2007b; Kim y col 2010a). Esta proteína posee 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 y pre-ARNm (pre-ARN mensajero), mediante modificaciones como la adición de 5-metilguanosina, poliadenilación, transporte, estabilidad y traducción del ARNm (Kim y col 2005; Kim y col 2007b).

El gen *GR-RBP* se expresó diferencialmente al día 20 de almacenamiento en frío (Figura 8) y después de los 7 días de maduración (Figura 9), siendo mayor en los frutos con TH, lo que concuerda con la mayor acumulación de la proteína GR-RBP reportada previamente por Valenzuela-Ponce (2016) para frutos de tomate cv Imperial con TH expuestos a las mismas condiciones del presente estudio y con lo reportado por Vega-García y col (2010), quienes observaron una mayor abundancia de dicha proteína en el tejido de tomate sano respecto al dañado del mismo cultivar expuesto a temperaturas de DF sin TH previo. En ambos estudios se observó una mayor acumulación de la proteína GR-RBP en tejido de tomate con menor incidencia de síntomas de daño por frío, lo que corresponde con lo observado en el presente estudio.

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 ARN (Ambrosone y col 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 2010b).

4 Genes relacionados con la maduración

a Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACS4) y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa (ACO1)

El etileno es una fitohormona reguladora de los procesos bioquímicos que ocurren durante la maduración y aclimatación a diferentes tipos de estrés, biótico y abiótico (Barry y Giovannoni 2007). Su biosíntesis está a cargo de las enzimas ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACS) y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa (ACO); ACS cataliza el primer paso en la ruta de biosíntesis de etileno, la conversión de S-adenosil-L-metionina a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), mientras que ACO cataliza el paso final, la oxidación de ACC a etileno (Yang y Hoffman 1984; Kende 1993). En tomate se ha encontrado que ACS es codificada por una familia de ocho genes (*LeACS1A, LeACS1B, LeACS2, LEACS3, LEACS4, LeACS5 LeACS6, LeACS7*), mientras que ACO es codificada por cuatro genes (*LeACO1, LeACO2 LeACO3, LeACO4*); *LeACS1A, LeACS2, LEACS3, LEACS4, LeACS6, LeACO1, LeACO3 y LeACO4* son expresados durante la maduración del fruto y sus niveles son dependientes del estado de madurez (Barry y col 1996; Nakatsuka y col 1998; Barry y col 2000).

A la fecha se han propuesto dos sistemas de regulación en la biosíntesis de etileno; el sistema 1 es el responsable de los niveles basales presentes en frutos no climatericos y durante el crecimiento del tejido vegetativo, mientras que el sistema 2 opera durante la maduración de frutos climatericos y la senescencia de flores, es autocatalítico y requiere la inducción de los genes *ACS* y *ACO* (Barry y col 2000). Basado en los patrones de expresión, así como en su regulación por el etileno, se ha

propuesto que en el sistema 2 participan los genes *LeACS2*, *LeACS4*, *LeACO1 y LeACO4*, mientras que el sistema 1 presente en frutos de tomate verde-maduro y tejido vegetativo es regulado por *LeACS1*, *LeACS6*, *LeACO2 y LeACO3* (Nakatsuka y col 1998; Barry y col 2000).

En el presente estudio se encontró una expresión significativamente (P<0.05) mayor de los genes ACS4 y ACO1 en frutos de tomate con TH después de su almacenamiento a bajas temperaturas (20 días a 5 °C) (Figura 8), lo cual podría estar relacionado con una mayor biosíntesis de etileno que pudiera estar induciendo la expresión de algunos grupos de genes relacionados con tolerancia a bajas temperaturas. Zhao y col (2009a; 2009b) reportaron una relación entre la expresión del gen LeCBF1 y la producción endógena de etileno en frutos de tomate almacenados a temperatura de DF (21 días a 2 °C); también observaron un mayor nivel de transcritos de este gen en el cultivar tolerante (cv Santiam) respecto al susceptible (cv Lichun); LeCBF1 en Arabidopsis codifica para un factor de transcripción, cuya expresión en plantas de tomate resulta en una mayor tolerancia a bajas temperaturas y una mayor expresión de genes que codifican para proteínas antioxidantes como catalasa (Hsieh y col 2002). En este sentido, Zhang y col (2011b) analizaron el efecto de la expresión del gen CBF1 de Arabidopsis en plantas de tomate que fueron expuestas a estrés por frío. Estos autores sugirieron que la proteína codificada por CBF1 podría estar contribuyendo a la protección de los fotosistemas I y II del estrés provocado por las bajas temperaturas, al observar una mayor eficiencia fotoquímica, menor contenido de MDA y una mayor actividad enzimática de SOD en plantas que poseían el gen respecto a las no transformadas.

En diversos estudios se ha observado que la aplicación de un tratamiento térmico induce la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de etileno. Lurie y col (1996) reportaron que la aplicación de un tratamiento térmico (3 días a 38 °C) en frutos de tomate resultaba en una mayor expresión génica de *ACO* al término del almacenamiento en frío (14 días a 2 °C), así como durante la maduración del fruto. Ellos asociaron dicha expresión con una mayor biosíntesis de etileno en los frutos tratados térmicamente y que presentaron una maduración más uniforme. Algo similar fue reportado por Cruz-Mendívil y col (2015), quienes al analizar los cambios transcripcionales relacionados con tolerancia al DF inducida por TH en tomate Micro-Tom encontraron una mayor expresión de genes para ACO y ACS en frutos tratados y que presentaban menores síntomas de DF. Estos resultados coinciden con lo observado en el presente estudio, sugiriendo un papel importante del etileno en la adquisición de dicha tolerancia.

Respecto al periodo de maduración, la expresión de los genes *ACS4* y *ACO1* fue significativamente (P<0.05) mayor en los frutos con TH (Figura 9), lo cual pudiera estar relacionado con la maduración más uniforme observada en los frutos como posible resultado de una mayor biosíntesis de etileno, ya que es la principal hormona que regula la actividad enzimática y expresión génica de proteínas involucradas en los diversos procesos bioquímicos relacionados con la maduración normal del fruto, como la biosíntesis de carotenoides (*PSY, CRTISO* y *PZD*) y compuestos volátiles (*TomloxA, B y C*), metabolismo de pared celular (*PG, PME y LeEXP1*) y carbohidratos (malato deshidrogenasa e invertasa) (Jeffery y col 1984; DellaPenna y col 1989; Sitrit y Bennett 1998; Smith y Gross 2000; Cosgrove 2000; Rugkong y col

2011). Esto coincide con lo reportado por Rugkong y col (2011) guienes observaron una mayor producción de etileno y expresión de genes relacionados con su biosíntesis (ACS2, ACS4 y ACO1) y ruta de señalización (LeETR1, NR y LeETR4) en frutos de tomate almacenados durante 7 días a 3 °C y que presentaron una maduración normal respecto a los almacenados durante dos o más semanas bajo las mismas condiciones. Ellos sugirieron que el etileno podría estar jugando un papel muy importante al restaurar la maduración normal del fruto, ya que la mayor producción de etileno observada coincidió con la mayor expresión de genes relacionados con la biosíntesis de carotenoides [fitoeno sintasa (PSY) y carotenoide simerasa (CRTISO)] y compuestos volátiles [lipoxigenasa (TromloxC), alcohol deshidrogenasa (ADH2) y alcohol acyl transferasa (ATT)]. Por su parte, Su y col (2015) analizaron el efecto de fitohormonas sobre la biosíntesis y acumulación de carotenoides durante la maduración de frutos de tomate cv Micro-Tom. Ellos observaron una mayor acumulación de carotenoides y sus precursores, principalmente licopeno, β-caroteno, fitoeno y fitoflueno en frutos tratados con etileno, lo cual asociarion con una mayor expresión de genes relacionados con su biosíntesis (PSY, ZIZO y CRTISO).

b Fitoeno sintasa 1 (*PSY-1*)

El cambio de coloración del fruto de tomate es una de las características más notables durante la maduración y representa el atributo de calidad más importante para los consumidores ya que es un indicador del grado de madurez. Dicho cambio se debe a la degradación de clorofila y posterior biosíntesis de carotenoides, principalmente licopeno; la ruta biosintética del licopeno inicia con la formación de

fitoeno a partir de la condenación de dos moléculas de geranil geranil pirofosfato (GGP) reacción catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY); posteriormente se llevan a cabo una serie de desaturaciones e isomerizaciones catalizadas por las enzimas fitoeno desaturasa (PDS), ζ-caroteno desaturasa (ZDS), ζ-caroteno isomerasa (ZISO) y prelicopeno isomerasa (CRTISO) para finalmente dar lugar al licopeno (Fraser y Bramley 2004).

La biosíntesis de fitoeno representa el primer paso comprometido y cuello de botella en la formación de licopeno y principal etapa sujeta a regulación por manipulación genética (Fraser y Bramley 2004; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción 2012). En tomate, la proteína fitoeno sintasa (PSY) esta codificada por dos genes (*PSY-1* y *PSY-2*); *PSY-2* es el responsable de la biosíntesis de carotenoides en tejidos que poseen cloroplastos, mientras que *PSY-1* está relacionado con la formación de carotenoides durante la maduración del fruto (Fraser y col 1999).

La mayor expresión del gen *PSY1* observada en los frutos tratados hidrotérmicamente durante el almacenamiento a temperaturas bajas (20 días a 5 °C) (Figura 8) así como después del periodo de maduración (7 días a 21 °C) (Figura 9), coincidió con la coloración roja más uniforme y mayor expresión génica de *ACS4* y *ACO1* presentada por los frutos. Algo similar fue reportado por Lurie y col (1996), quienes observaron mayor expresión de *PSY* en frutos de tomate tratados térmicamente (3 días 38 °C) previo a su almacenamiento a temperatura de daño por frío (14 días a 2 °C), lo que coincidió con el mayor avance hacia la coloración roja del fruto durante la maduración. Por su parte, Rugkong y col (2011) al analizar el efecto de las bajas temperaturas (7, 14, 21 y 28 días a 3 °C) sobre la expresión de genes

relacionados con la maduración del fruto, encontraron una mayor expresión del gen PSY1 en los frutos de tomate almacenados durante 7 días respecto a los almacenados durante 14, 21 y 28 días, lo que relacionaron con la mayor acumulación de licopeno y el desarrollo normal de la coloración roja durante la maduración. También observaron una relación entre la expresión de los genes PSY, ACS2, ACS4 y ACO1 y la producción endógena de etileno. En otro estudio realizado por Cruz-Mendívil y col (2015), al investigar los mecanismos moleculares relacionados con tolerancia inducida al DF por medio de un tratamiento hidrotérmico en frutos de tomate Micro-Tom, observaron una mayor expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de carotenoides (PSY1 y PSY2) y etileno (ACO y ACS) en frutos de tomate con TH que presentaron menores síntomas de DF y una coloración roja más uniforme al término del periodo de maduración (14 días a 20 °C) en comparación con los frutos no tratados. Los resultados del presente estudio concuerdan con lo reportado por estos autores, sugiriendo que la coloración roja más uniforme presentada por los frutos de tomate con TH es consecuencia de una mayor expresión del gen PSY cuyo producto podría estar incrementando el flujo de fitoeno hacia la biosíntesis de licopeno.

c Poligalacturonasa (*PG*)

Otro gen que se expresó diferencialmente durante el almacenamiento de tomate a temperaturas bajas es el que codifica para la proteína poligalacturonasa (PG), enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces glucosídicos β-1,4 entre residuos adyacentes de ácido galaturónico (Niture 2008). El ácido D-galacturónico es el componente principal de las pectinas presentes en la lámina media y pared celular

primaria de células vegetales, por lo que la actividad enzimática de PG junto con la de otras como pectil metil esterasa (PME) y β-galactosidasa son cruciales para que se lleven a cabo las modificaciones de la pared celular relacionadas con los cambios en textura observados en frutos (Brummell y Harpster 2001).

En frutos de tomate, aun no está claro el papel que desempeña PG en la solubilización de la pared celular, puesto que en algunos estudios se ha observado una correlación entre la expresión y actividad enzimática de PG y el grado de solubilización de pectinas, mientras que en otros no se ha encontrado dicha correlación (Smith y col 1990; Carrington y col 1993; Brummell y Labavitch 1997; Almeida y Huber, 2008). Algo muy similar se ha observado entre la hormona etileno y la expresión del gen PG, sugiriendo que este es regulado tanto en forma dependiente como independiente de etileno (Theologis y col 1993). En el presente estudio se observó una expresión significativamente (P<0.05) menor del gen PG en los frutos de tomate con TH al término del almacenamiento en frío (Figura 8), lo que concuerda con lo reportado por Cruz-Mendívil y col (2015) quienes observaron una menor expresión de 5 genes relacionados con el metabolismo de la pared celular, entre ellos 3 que codifican para poligalacturonasas, en frutos de tomate tratados hidrotérmicamente y que presentaron menores síntomas de DF. Estos autores sugirieron que la menor expresión de estos genes podría estar contribuyendo a mantener la integridad de la pared y turgencia celular durante el almacenamiento en frío, visualizándose en menor pérdida de agua y marchitamiento. Biswas y col (2014) al analizar los efectos de las bajas temperaturas sobre las propiedades de textura en frutos de tomate almacenados a 2.5 y 6 °C durante 27 días, observaron que la

pérdida de la integridad y turgencia celular eran la principal consecuencia del almacenamiento a las respectivas temperaturas.

Kagan-Zur y col (1995) analizaron la regulación en la expresión, acumulación y actividad enzimática de las proteínas poligalacturonasa (PG) y pectil metil esterasa (PME) durante y después de un tratamiento térmico en frutos de tomate. En general, ellos encontraron que la expresión, acumulación y actividad enzimática de PG y PME disminuyeron en los frutos durante y después del tratamiento térmico, pero el efecto fue más drástico en PG ya que ni la aplicación exógena de etileno contrarrestó el nivel bajo de expresión génica de dicha proteína, el cual solo se recupero parcialmente una vez que el fruto fue transferido a temperatura de 20 °C.

Durante el periodo de maduración se observó un incremento en la expresión génica de *PG* en los frutos de tomate con TH, contrarrestando la mayor expresión observada en frutos sin TH durante el almacenamiento en frío, de tal forma que después de la maduración no se encontraron diferencias significativas entre ellos (Figura 9). Este incremento podría ser consecuencia de un evento cascada, el cual inicia con la exposición del fruto a temperaturas superiores a la crítica, lo que pudiera estar provocando una mayor sensibilidad al etileno producido durante la maduración por ACS4 y ACO1 en frutos con TH. Un comportamiento similar al del presente estudio fue observado por Lurie y col (1997) en frutos de tomate cv Daniella tratados térmicamente (38 °C por 3 días) y expuestos a estrés por frío (14 días a 2 °C). Ellos sugirieron que la aplicación de un pre-tratamiento térmico previo al almacenamiento en frío, además de controlar enfermedades provocadas por insectos u hongos, induce cierta tolerancia a las bajas temperaturas mediante cambios en la expresión

génica, acumulación y actividad enzimática de proteínas como HSP, ACO, PSY y PG.

Los resultados sugieren que la aplicación de un tratamiento hidrotérmico disminuye la expresión de *PG*; dicha expresión se mantiene como consecuencia de la exposición a bajas temperaturas y se recupera al transferir el fruto a temperatura de maduración mediante un evento cascada provocado por el etileno, ya que se ha encontrado la presencia de un promotor inducible por etileno en genes que codifican para poligalacturonasas en tomate (Nicholass y col 1995).

D CONSIDERACIONES SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA TOLERANCIA AL DAÑO POR FRÍO

Los resultados del presente trabajo concuerdan con otros autores al ubicar 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 expresión de los genes antioxidantes *SOD*, *APX*, *TPX* y *GST* es consistente con la acumulación y actividad enzimática de proteínas reportada en estudios previos (Cárdenas-Torres 2013; Valenzuela-Ponce 2016) en este mismo cultivar, siendo mayor en los frutos con TH respecto a los no tratados. Estas proteínas participan en la detoxificación de radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, hidroperoxidos y la regeneración de moléculas antioxidantes como el ácido ascórbico, por lo que el incremento en los niveles de transcritos al parecer es reflejado en una mayor acumulación y actividad enzimática, la cual podría ser clave

en la protección contra el estrés oxidativo y podría estar contribuyendo en la eliminación el exceso de ROS y con ello disminuir los daños que provocan en las membranas de los tejidos, induciéndole a los frutos tolerancia al DF. Aunado a esto, el nivel más alto de transcritos del gen XI, así como su mayor abundancia en cuanto a proteína (Valenzuela-Ponce 2016), podría estar relacionado con la activación de la ruta de las pentosas fosfato para proporcionar la cantidad suficiente del agente reductor NADPH requerido por el sistema antioxidante.

El tratamiento hidrotérmico de los frutos de tomate cv imperial resultó en una mayor expresión del gen y acumulación de la proteína de choque térmico de bajo peso molecular (HSP17.6) (Valenzuela-Ponce 2016). La presencia de proteínas de choque térmico de bajo y alto peso molecular en tomate ha sido considerada como una de las primeras respuestas del tejido al DF, para prevenir la desnaturalización de las proteínas bajo condiciones de estrés mediante su actividad chaperona (Sabehat y col 1996; Löw y col 2000; Sánchez-Bel y col 2012).

La proteína rica en glicina que se une al ARN (GR-RBP), la cual presentó una mayor expresión génica y acumulación en tejido sano y tratado hidrotérmicamente (Vega-García y col 2010; Valenzuela-Ponce 2016), 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.

La exposición del tejido a una temperatura baja resulta en cambios tanto a nivel transcriocional como a nivel proteómico de enzimas relacionadas con 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). Al respecto, en el presente estudio se observó una mayor expresión del gen triosa fosfato isomerasa (*TPI*), lo que coincidió con una mayor acumulación de esta proteína (Valenzuela-Ponce 2016) en tejido sin TH. TPI es una enzima importante 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. Esta enzima, en conjunto con la subunidad II del complejo citocromo c reductasa/peptidasa de procesamiento mitocondrial, podrían trabajar coordinadamente en el remplazo de proteínas dañadas en mitocondria, uno de los principales organelos afectados por el estrés por frío (Jing y col 2009).

El etileno es una de las hormonas más importantes involucrada en diversos procesos como la regulación de la expresión génica en respuesta a las bajas temperaturas, así como en los cambios de color y firmeza observables durante la maduración del fruto (Nicholass y col 1995; Zhao y col 2009a; 2009b). La mayor expresión de los genes *ACS4* y *ACO1* del presente estudio, podría reflejarse en una mayor producción de etileno, hormona que pudiera estar induciendo la expresión de genes relacionados con tolerancia a bajas temperaturas (*LeCBF1*) y ser clave en la restauración de la maduración mediante la regulación en la expresión de genes relacionados con dicho proceso como *PSY1* y *PG*, evidenciándose por los menores síntomas de DF presentados por los frutos tratados térmicamente y un mayor avance hacia la coloración roja característica del fruto en estado maduro.

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 enzimática de proteínas codificadas por los genes evaluados, ya que la expresión génica no necesariamente se ve reflejada en una mayor abundancia de proteínas y a su vez una mayor abundancia de proteínas no necesariamente se relaciona adecuadamente con su actividad. 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

- La efectividad del tratamiento hidrotérmico (TH) para inducir tolerancia al DF en frutos de tomate se evidenció en menor IDF, menor fuga de electrolitos y menor peroxidación de lípidos.
- El TH indujo una mayor expresión de los genes HSP17.6 y GR-RBP por lo que sus proteínas podrían estar contribuyendo en la adquisición de tolerancia al DF mediante su acción de chaperona y de regulación de la expresión génica.
- La expresión de algunos genes que codifican para proteínas del sistema antioxidante (TPX1, APX2 y GST) fue mayor en los frutos con TH almacenados por 20 días a 5 °C, lo que sugiere un papel importante de estas enzimas en la neutralización de los radicales libres producidos por el estrés por frío.
- Se observó una mayor expresión de los genes TPI y β-MPP en frutos sin TH y
 con mayor incidencia de síntomas de daño por frío, lo cual podría relacionarse
 con una mayor necesidad energética y de reemplazo de proteínas dañadas
 debido al daño celular provocado durante la exposición a temperaturas bajas.
- La mayor expresión de los genes *ACS4* y *ACO1* en los frutos de tomate con TH, sugiere que la hormona etileno podría estar desempeñando un papel muy importante en la adquisición de tolerancia al DF y restauración del proceso normal de maduración mediante la regulación de la expresión de genes relacionados con metabolismo de pared celular (*PG*) y biosíntesis de carotenoides (*PSY-1*).

- Los frutos con TH mostraron una mayor expresión de los genes CuZn SOD, APX2, TPX1 y GST después del periodo de maduración a 21 °C, lo que sugiere que estas enzimas son muy importantes para contrarrestar el estrés oxidativo asociado con el proceso de maduración y que podría potencializar los síntomas del DF.
- Los resultados sugieren que la tolerancia al DF esta asociada con la inducción de la expresión de genes relacionados con el estrés térmico y oxidativo, cuyos productos pudieran estar actuando de manera conjunta para mantener la integridad y homeostasis celular, previniendo los síntomas como maduración irregular mediante la regulación de genes involucrados en la biosíntesis de etileno y carotenoides.

IX BIBLIOGRAFÍA

- Aghdam MS, Asghari M, Khorsandi O, Mohayeji M. 2014. Alleviation of postharvest chilling injury of tomato fruit by salicylic acid treatment. Journal of Food Science and Technology 51(10):2815–2820.
- 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.
- Allen RD. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. Plant Physiology 107:1049–1054.
- Almeida DPF, Huber DJ. 2008. In vivo pectin solubility in ripening and chillinjured tomato fruit. Plant Science 174:174–182.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany, Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants 272(53):1331–1341.
- 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.
- Asada K, Takahashi M, Tanaka K, and Nakano N. 1977. Formation of active oxygen and its fate in chloroplasts. En: Hayashi O and Asada K, editores. Biological and Medical Aspects of Active Oxygen. Tokyo. Science Societies Press. pp. 45–63.
- Awad J, Stotz HU, Fekete A, Krischke M, Engert C, Havaux M, Berger S, Mueller MJ. 2015. 2-cysteine peroxiredoxins peroxiredoxins and thylakoid ascorbate peroxidase create a water-water cycle that is essential to protect the photosynthetic apparatus under high light stress conditions. Plant Physiology 167:1592–603.
- 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.
- Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow MF. 1994. The 5 region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has *cis*-acting elements that confer cold, drought and ABA-regulated gene expression. Plant Molecular Biology 24:701–713.
- Ball JA. 1997. Evaluation of two lipid based edible coatings for their ability to preserve post harvest quality of green ball peppers. [Tesis de Maestría]. Blacksburg Virginia: Department of Human Nutrition, Foods and Exercise, Polytechnic Institute and State University. 89 p.
- Balmer Y, Koller A, del Val G, Marieri W, Schürmann P, Buchanan BB. 2003. Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 100(1):370-375.
- Barka EA, Kalantari S, Makhlouf J, Arul J. 2000. Impact of UV-C irradiation on the cell wall-degrading enzymes during ripening of tomato (Lycopersicon esculentum L.) fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48:667-671.
- Barone A, Di Matteo A, Carputo D, Frusciante L. 2009. High-throughput genomics enhances tomato breeding effciency. Current Genomics 10:1-9.
- Barry CS, Blume B, Bouzayen M, Cooper W, Hamilton AJ, Grierson D. 1996. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. The Plant Journal 9(4):525-535.
- Barry CS, Giovannoni JJ. 2007. Ethylene and fruit ripening. Journal Plant Growth Regulation 26:143–159
- Barry CS, Llop-Tous MI, Grierson D. 2000. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. Plant Physiology 123:979-986.

- Bergougnoux V. 2014. The history of tomato: from domestication to biopharming. Biotechnology Advances 32:170-189.
- Bhattacharjee S. 2012. The language of reactive oxygen species signaling in plants. Journal of Botany 2012:1-22.
- Biais B, Bénard C, Beauvoit B, Colombié S, Prodhomme D, Ménard G, Bernillon S, Gehl B, Gautier H, Ballias P, Mazat JP, Sweetlove L, Génard M, Gibon Y. 2014. Remarkable reproducibility of enzyme activity profiles in tomato fruits grown under contrasting environments provides a roadmap for studies of fruit metabolism. Plant Physiology 164:1204–1221.
- Biswas P, East AR, Hewett EW, Heyes JA. 2014. Interpreting textural changes in low temperature stored tomatoes. Postharvest Biology and Technology 87:140–143.
- 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. PloSONE 7:10: e48198.
- Bohnert HJ, Jensen RG. 1996. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. Trends in Biotechnology 14:89–97.
- Boston RS, Viitanen PV, Vierling E. 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. Plant Molecular Biology 32:191–222.
- Brehelin C, Meyer EH, de Souris JP, Bonnard G, Meyer Y. 2003. Resemblance and dissemblance of Arabidopsis type II peroxiredoxins: similar sequences for divergent gene expression, protein localization, and activity. The Journal of Plant Physiology 132:2045–2057.
- 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.
- Brummell DA, Harpster MH. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. Plant Molecular Biology 47:311–340.

- Brummell DA, Labavitch JM. 1997. Effect of antisense suppression of endopolygalacturonase activity on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and in fruit homogenates. Plant Physiology 115:717–725.
- Caffagni A, Pecchioni N, Francia E, Pagani D, Milc J. 2014. Candidate gene expression profiling in two contrasting tomato cultivars under chilling stress. Biologia Plantarum 58: 283-295.
- 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.
- Carrington CMS, Greve LC, Labavitch JM. 1993. Cell wall metabolism in ripening fruit. VI. Effect of the antisense polygalacturonase gene on cell wall changes accompanying ripening in transgenic tomatoes. Plant Physiology 103:429–434.
- Chalmers DJ, Rowan KS. 1971. The climacteric in ripening tomato fruit. Plant Physiology 48:235-240.
- Chan AC. 1998. Vitamin E and atherosclerosis. Journal of Nutrition 128:1593-1596.
- Chassy AW, Bui L, Renaud EN, Van Horn M, Mitchell AE. 2006. Three-Year comparison of the content of antioxidant microconstituents and several quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and bell peppers. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54:8244-8252.
- Cheng F, Yin LL, Zhou J, Xia XJ, Shi K, Yu JQ, Zhou YH, Foyer CH. 2016. Interactions between 2-Cys peroxiredoxins and ascorbate in autophagosome formation during the heat stress response in *Solanum lycopersicum*. Journal of Experimental Botany 67(6):1919-1933.
- Cho MR, Lee KH, Hyun YB, Lee I, 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.
- Clendenning BK. 1942. The respiratory and ripening betiaviour of the tomato fruit on the plant. Canadian Journal of Research 20(4):197-203.

- 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 101(42):15243-15248.
- Cosgrove DJ. 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. Nature 407:321–326.
- Costa JM, Heuvelink E. 2005. Introduction: the tomato crop and industry. En: Heuvelink E editor. Tomatoes. Cambridge, MA: CABI Publishing. pp 1-19.
- 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.
- 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.
- Criddle RS, Smith BN, Hansen LD. 1997. A respiration based description of plant growth rate responses to temperature. Planta 201:441–445.
- Crisosto CH, Garner D, Crisosto G. 2002. High carbón dioxide atmosphere affect stored 'Thompson Seedles' table grape. HortScience 37:1074-1078.
- Cruz-Bojórquez RM, González JG, Sánchez PC. 2013. Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. Nutrición Hospitalaria 28:6-15.
- Cruz-Mendívil A, López-Valenzuela J, 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.
- Csiszár J, Horváth E, Váry Zsolt, Gallé A, Bela k, Brunner S. 2014. Glutathione transferase supergene family in tomato: salt stress-regulated expression of representative genes from distinct GST classes in plants primed with salicylic acid. Plant Physiology and Biochemistry 78:15-26.

- DellaPenna D, Lincoln JE, Fischer RL, Bennett AB. 1989. Transcriptional analysis of polygalacturonase and other ripening associated genes in rutgers, rin, nor, and Nr tomato fruit. Plant Physiology 90:1372-1377.
- 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, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annum*. Molecular Plant Microbe Interactions 16(3):196-205.
- Dong JZ, Dunstan DI. 1996. Characterization of three heat-shock- protein genes and their developmental regulation during somatic empryogenesis in white spruce. Planta 200:85–91.
- Dumas Y, Dadomo M, Lucca MD, Grolier P. 2003. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. Journal of the Science of Food and Agriculture 83:369–382.
- Ellis RJ, Van der Vies SM. 1991. Molecular chaperones. Annual Review of Biochemistry 60:321–347.
- Elstner EF. 1991. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. En: Pell EJ, Steffen KL, editores. Active oxygenuoxidative stress and plant metabolism. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists pp 13–25.
- 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.

- 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.
- Esquinas-Alcázar JT, Nuez VF. 1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. En: Nuez F, editor. El cultivo del tomate. Madrid: Ediciones Mundi Prensa, pp 15-42.
- Fallik E. 2004. Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). Postharvest Biology and Technology 32:125-134.
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization. Statistical Database. 2016. Canadá: Food and Agriculture Organization. Disponible en: http://faostat.fao.org. Consultado el 29 de junio de 2016.
- Farah A, Donangelo CM. 2006. Phenolic compounds in coffee. Brazilian Journal of Plant Physiology 18:23–36.
- Ferreira MD, Franco TOA, Kasper RF, Ferraz ACO, Honório SL, Tavares M. 2005. Post-harvest quality of fresh marketed tomatoes as a function of harvest periods. Scientia Agricola 62(5):446-451.
- Finkemeier I, Goodman M, Lamkemeyer P, Kandlbinder A, Sweetlove LJ, Dietz KJ. 2005. The mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of Arabidopsis thaliana under stress. Journal of Biological Chemistry 280:12168–12180.
- Fraser PD, Bramley PM. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. Progress in Lipid Research 43:228–265.
- Fraser PD, Kiano JW, Truesdale MR, Schuch W, Bramley PM. 1999. Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. Plant Molecular Biology 40:687–698.
- Fraser PD, Truesdale MR, Bird CR, Schuch W, Bramley PM. 1994. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. Plant Physiology 105:405-413.

- Fridovich I. 1986. Superoxide dismutases. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular 58:61–97.
- Frova C. 2003. The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. Physiologia plantarum 119: 469–479.
- Gakh O, Cavadini P, Isaya G. 2002. Mitochondrial processing peptidases. Biochimica et Biophysica Acta 1592:63–77.
- 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 JM, Hernandez JA, Jimenez A, del Rio LA, Sevilla F. 1999. Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long term NaCl stress of pea plants. Free Radical Research 31:S11–S18.
- Gómez P, Ángeles MF, 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 Science Food Agriculture 89:1543–1551
- González-Aguilar GA, Tiznado-Hernández ME, Zavaleta-Gatica R, Martinez-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.
- 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. pp 241-80.
- Guy C. 1999. The influences of temperature extremes on gene expression, genomic structure, and the evolution of induced tolerance in plants. En: Lerner HR, Editor. Plant responses to environmental stresses: from phytohormones to genome reorganization. New York: Marcel Dekker pp 497-548.
- Haider S, Pal R. 2013. Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data. Current Genomics 14:91-110.

- 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.
- Hardenburg RE, Watada AE, and Wang CY. 1986. The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks. Washington DC: Agriculture Handbook 66, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. pp 780.
- Hartl FU, Neupert W. 1990. Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. Science 247:930-938.
- Helm KW, Lafayette PR, Nagao RT, Key JL, Vierling E. 1993. Localization of small heatshock proteins to the higher plant endomembrane system. Molecular and Cellular Biology 13:238–247.
- 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. 2011. Effect of different environmental stresses on the expression of oleate desaturase genes and fatty acid composition in olive fruit. Phytochemistry 72:178-187.
- Hobson GE, Grierson D. 1993. Tomato. En: Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA, editors. Biochemistry of Fruit Ripening. London, England: Chapman y Hall. pp 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 P. 2004. Oxidative stress: importance for postharvest quality: oxidative stress: postharvest fruits and vegetables. HortScience 39:924–929.
- Hsieh TH, Lee JT, Yang PT, Chiu LH, Chamg YY, Wang YC, Chan MT. 2002. Heterology expression of the *ARABIDOPSIS* Crepeat/dehydration response

- element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. Plant Physiology 129:1086-1094.
- Ioannidi E, Kalamaki MS, Engineer C, Pateraki I, Alexandrou D, Mellidou I, Giovannonni J, Kanellis AK. 2009. Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. Journal of Experimental Botany 60(2): 663–678.
- 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.
- Jeffery D, Smith C, Goodenough P, Prosser I, Grierson D. 1984. Ethylene-independent and ethylene-dependent biochemical changes in ripening tomatoes. Plant Physiology 74:32–38.
- Jiang HW, Liu MJ, Cheng IC, Huang CH, Chao LY, Hsieh HL. 2010. A glutathione-s-transferase regulated by ligth and hormones participates in the modulation of Arabidopsis seedling development. Plant Physiology 154:1646-1658.
- Jiménez A, Greissen G, Kular B, Firmin J, Robinson S, Verhoeyen M y Mullineaux P. 2002. Changes in oxidative process and components of the antioxidants system during tomato fruit ripening. Planta 214:751-758.
- 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.
- Jing Y, Mao-run F, Yu-ying Z, Lin-chun M. 2009. Reduction of chilling injury and ultrastructural damage in cherry tomato fruits after hot water treatment. Agricultural Sciences in China 8(3):304-310.
- Jones JB. 1999. Tomato plant culture: in the field, green house and home garden. Boca Ratón, FL: CRC Press. 199 p.
- Kadyrzhanova DK, Vlachonasios KE, Ververidis P, Dilley DR. 1998. Molecular cloning of a novel heat induced/chilling tolerance related cDNA1 in tomato fruit by use of mRNA differential display. Plant Molecular Biology 36:885–895.

- Kagan-Zur V, Tieman DM, Marlow SJ, Handa AK. 1995. Differential regulation of polygalacturonase and pectin methylesterase gene expression during and after heat stress in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits. Plant Molecular Biology 29:1101-1110.
- Kasamo K, Kagita F, Yamanishi H, Sakaki T. 1992. Low temperature induced changes in the termotropic properties and fatty acid composition of plasma membrane and tonoplast of cultured rice (*Oriza sativa* L.). Plant and Cell Physiology 33:609-616.
- Kasamo K, Yamaguchi M, Nakamura Y. 2000. Mechanism of the chilling induced decrease in proton pumping across the tonoplast of rice. Plant and Cell Physiology 41:840-849.
- Kende H. 1993. Ethylene biosynthesis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 44:283-307.
- Kerdnaimongol 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.
- Kitamura S, shikazomo N, Tanaka A. 2004. TRANSPARENT TESTA is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in ARABIDOPSIS. Plant Journal 37:104-114.
- 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.
- La Fata G, Weber P, Mohajeri MH. 2014. Effects of vitamin E on cognitive performance during ageing and in Alzheimer's disease. Nutrients 6:5453-5472.
- Labate JA, Grandillo S, Fulton T, Muños S, Caicedo AL, Peralta I, Ji Y, Chetelat RT, Scott KW, Gonzalo MJ, Francis D, Yang W, Knaap EVD, Baldo AM, Smith-White B, Mueller LA, Prince JP, Blanchard NE, Storey DB, Stevens MR, Robbins MD, Wang JF, Liedl BE, O'Connell MA, Stommel JR, Aoki K, Iijima Y, Slade AJ, Hurst SR, Loeffler D, Steine MN, Vafeados D, McGuire C, Freeman C, Amen A, Goodstal J, Facciotti D, Van Eck J, Causse M. 2007. Tomato. En: Kole C, editor. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. pp.1-125.
- LaFayette PR, Nagao RT, O'Grady K, Vierling E, Key JL. 1996. Molecular characterization of cDNAs encoding low molecular weight heat shock proteins of soybean. Plant Molecular Biology 30:159–16.

- Lafuente MT, Zacarias L. 2006. Postharvest physiological disorders in citrus fruit. Stewart Postharvest Review 2:1–9.
- Le Martret B, Poage M, Shiel K, Nugent GD, Dix PJ. 2011. Tobacco chloroplast transformants expressing genes encoding dehydroascorbate reductase, glutathione reductase, and glutathione-s-transferase, exhibit altered antioxidant metabolism and improved abiotic stress tolerance. Plant Biotechnology Journal 9:661–673.
- Lee GJ. 1995. Assaying proteins for molecular chaperone activity. Methods in Cell Biology 50:325–334.
- Lee SH, Ahn SJ, Im YJ, Cho K, Chung GC, Cho BH. 2005. Differential impact of low temperature on fatty acid unsaturation and lipoxygenase activity in fig, leaf, gourd and cucumber roots. Biochemical and Biophysical Research Communications 330:1194–1198.
- Lenne C, Douce R. 1994. A low molecular mass heat-shock proteins is localized to higher plant mitochondria. Plant Physiology 105:1255–1261.
- Leshem Y, Kuiper P. 1996. Is there a GAS (General Adaption Syndrome) responses to various types of environmental stress? Biologia Plantarum 38:1-18.
- Liu H, Ouyang B, Zhang J, Wang T, Li H, Zhang Y, Yu C, Ye Z. 2012. Differential modulation of photosynthesis, signaling, and transcriptional regulation between tolerant and sensitive tomato genotypes under cold stress. PLoS ONE 7(11):1-16.
- 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.
- 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.

- Loyall L, Uchida K, Braun S, Furuya M, Frohnmeyer H. 2000. Glutathione and UV light-induced glutathione-s-transferase are involved in signaling to chalcone syntase in cell cultures. Plant Cell 12:2797-2813.
- Lucille A, Grierson D. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. Journal of Experimental Botany 53:2039-2055.
- Luengwilai K, Beckles DM, Saltveit ME. 2012. Chilling-injury of harvest tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is reduced by temperature pre-treatments. Posharvest Biology and Technology 63:123-128.
- Lurie S, Handros A, Fallik E, Shapiram R. 1996. Reversible inhibition of tomato fruit gene expression at high temperature. Plant Physiology 110:1207-1214.
- 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, Sabehat A. 1997. Prestorage temperature manipulations to reduce chilling injury in tomatoes. Postharvest Biology and Technology 11:57–62.
- Lurie S. 1998. Postharvest heat treatments. Postharvest Biology and Technology. 14:257-269.
- Luthria DL, Mukhopadhyaya S, Krizek DT. 2006. Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. Journal of Food Composition and Analysis 19:771-777.
- Lyons JM. 1973. Chilling injury in plants. Annual Review of Plant Physiology 24:445-466.
- 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. pp 171-201.
- Magiorkinis E, Beloukas A, Diamantis A. 2011. Scurvy: Past, present and future. European Journal of Internal Medicine 22:147-152.

- 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.
- Marondedze C, Gehring C, Thomas L. 2014. Dynamic changes in the date palm fruit proteome during development and ripening. Horticulture Research 1:1-15.
- Marrs KA. 1996. The functions and regulation of glutathione-s-transferases in plants.

 Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47:127–58.
- McColloch LP, Worthington JT. 1952. Low temperature as a factor in the susceptibility of mature-green tomatoes to *Alternaria* rot. Phytopathology 42:425-427.
- 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. pp 5800-5808.
- Miernyk JA. 1990. Glycolysis, the oxidative pentose phosphate pathway and anaerobic respiration. En: Dennis DT, Turpin DH, editores. Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Harlow UK: Longman Scientific & Technical. pp 77-100.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Science 7:405–410.
- Mittova V, theodoulou FL, Kiddle G, Volokita M, Tal M, Foyer CH, Guy M. 2004. Comparison of mitochondrial ascorbate peroxidase in the cultivated tomato, Lycopersicon esculentum, and its wild, salt-tolerant relative, L. pennellii a role for matrix isoforms in protection against oxidative damage. Plant, Cell and Environment 27:237–250.

- Miura K, Shiba H, Ohta M, Kang SW, Sato A, Yuasa T, Iwaya-Inoue M, Kamada H, Ezura H. 2012. *SIICE1* encoding a MYC-type transcription factor controls cold tolerance in tomato, Solanum lycopersicum. Plant Biotechnology 29:253-260.
- Møller IM. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52:561-591.
- Mondal K, Sharma NS, Malthotra SP, Dhawan K, Singh R. 2004. Antioxidant systems in ripening tomato fruits. Biologia Plantarum 48(1):49-53.
- Monroy AF, Dhindsa RS. 1995. Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 °C. Plant Cell 7:321-331.
- Monroy AF, Sarhan F, Dhindsa RS, 1993. Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression. Evidence for a role of calcium. Plant Physiology 102:1227–1235.
- Moons A. 2005. Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione-s-transferase (GSTs). Vitamins and Hormones 72:155-202.
- Morris LL. 1982. Chilling injury of horticultural crops an overview. HortScience 17:161-162.
- Mulas M, Schirra M. 2007. The effect of heat conditioning treatments on the postharvest quality of horticultural crops. Stewart Postharvest Review 3:1–6.
- Najami N, Janda T, Barriah W, Kayam G, Tal M, Guy M, Volokita M. 2008. Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization. Molecular Genetics Genomics 279:171-182.
- Nakamura T, Matsumura H, Inoue T, Kai Y, Uegaki K, Hagihara Y, Ataka M, Ishikawa K. 2005. Crystallization and preliminary x-ray diffraction analysis of thioredoxin peroxidase from the aerobic hyperthermophilic Archaeon Aeropyrum pernix K1. Acta crystallographica. Structural Biology and Crystallization Communications 1(61):323-325.

- Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S, Nakano R, Kubo Y, Inaba A. 1998. Differential expression and internal Ffeedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate ynthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. Plant Physiology 118:1295–1305.
- 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.
- Nicholass FJ, Smith CJS, Schuch W, Bird CR, Grierson D. 1995. High levels of ripening-specific reporter gene expression directed by tomato fruit polygalacturonase gene flanking regions. Plant Molecular Biology 28:423–435.
- Nishida I, Murata N. 1996. Chilling sensitivity 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.
- Niture SK. 2008. Comparative biochemical and structural characterization of fungal polygalacturonase. Biologia 63:1-19.
- NRCS-USDA Natural Resources Conservation Service-United States Department of Agriculture. 2016. Washington: U. S. Derp. of Agriculture. Disponible en: http://plants.usda.gov (Consultado el 28 de junio de 2016).
- Ogawa K, Kanematsu S and Asada K. 1997. Generation of superoxide anion and localization of Cu/Zn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. Plant Cell Physiology 38:1118–1126.
- Omaye ST, Zhang P. 1998. Phytochemical interactions: β-carotene, tocopherol and ascorbic acid. En Bidlack WR, Omaye ST, Meskin MS, Jahner D, Editores.

- Phytochemicals a new paradigm. Lancaster, PA: Technomic Publishing, Co. pp 53-75.
- 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.
- Orzolek MD, Greaser GL, Harper. 2006. Agricultural alternatives. Pennsylvania: Penn State's College of Agricultural Sciences. Disponible en: http://extension.psu.edu/business/agalternatives/horticulture/vegetables/tomatopro duction/extension_publication_file. Consultado en febrero 2016.
- 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.
- Park EJ, Jeknic Z, Sakamoto A, DeNoma J, Yuwansiri R, Murata N, Chen TH. 2004. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants and flowers from chilling damage. Plant Journal 40:474-487.
- Parker R y Maalekuu BK. 2013. The effect of harvesting stage on fruit quality and shelf-life of four tomato cultivars (Lycopersicon esculentum Mill). Agriculture and Biology Journal of North America 4(3):252-259.
- Paull RE. 1990. Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. En: Wang CY, editor. Chilling injury of horticultural crops. Boca Raton: FL. CRC Press, Inc. pp 17-36.
- Pedrajas JR, Miranda-Vizuete A, Javanmardy N, Gustafsson JA, Spyrou G. 2000. Mitochondria of Saccharomyces cerevisiae contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. Journal of Biological Chemistry 275:16296–16301.
- Pichersky E, Gottlieb LD. 1984. Plant triose phosphate isomerase isozymes. Plant Physiology 74:340-347.

- Pirrello J, Regad F, Latche´ A, Pech JC, Bouzayen M. 2009. Regulation of tomato fruit ripening. Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 4:1-14.
- Polenta GA, Calvete JJ, González CB. 2007. Isolation and characterization of main small heat shock protein induced in tomato pericarp by thermal treatment. FEBS Journal 274:6447-6455.
- Porat R, Pavoncello D, Peretz J, Ben-Yehoshua S, Lurie S. 2000. Effects of various heat treatments on the induction of cold tolerance and on the postharvest qualities of 'Star Ruby' grapefruit. Postharvest Biology and Technology 18:159–165.
- Purvis AC, Shewfelt RL. 1993. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues?. Physiology Plant 88:712–718.
- Raison JK, Orr GR.1990. Proposals for a better understanding of the molecular basis of chilling injury. En CY Wang, editor. Chilling Injury of Horticultural Crops. Boca Raton FL: CRC Press. pp 145-164.
- Reddy AS, Ali GS, Celesnik H, Day IS. 2011. Coping with stresses: roles of calcium and calcium/calmodulin-regulated gene expression. Plant Cell 23:2010–2032.
- Ren J, Li C, Li C. 2012. Tomato genome gets fully decoded-paves way to tastier and halthier fruits. Journal of Genetics of Genomics 39:303-305.
- 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.

- 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.
- Rouhier N, Gelhaye E, Sautiere PE, Brun A, Laurent P, Tagu D, Gerard J, de Fay E, Meyer Y, Jacquot JP. 2001. Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. The Journal of Plant Physiology 127:1299–1309.
- Rouhier N, Jacquot JP. 2002. Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes. Photosynthesis Research 74:259–268.
- Rugkong A, McQuinn R, Giovannoni JJ, Rose JKC, Watkings CB. 2011. Expression of ripening-related genes in cold-stored tomato fruit. Postharvest Biology and Technology 61:1-14.
- Rugkong A, Rose JKC, Lee SJ, James J. Giovannoni, O'Neill MA, Watkins CB. 2010. Cell wall metabolism in cold-stored tomato fruit. Postharvest Biology and Technology 57:110-113.
- 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 1:1-28.
- Sabehat A, Lurie S, Weiss D. 1998. Expression of small heat-shock proteins at low temperature. Plant Physiology 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.
- 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.

- Sala JM, Lafuente MT.1999. Catalase in the heat-induced chilling tolerance of coldstored hybrid Fortune mandarin fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47:2410–2414.
- Saltveit ME Jr. Morris L. 1990. Overview on chilling injury of horticultural crops. En Wang CY, editor. Chilling injury of horticultural crops. Boca Ratón, FL: CRC Press, Inc. pp 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. pp 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. pp 581-587.
- Scandalios JG. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. Plant Physiology 101:7–12.
- Schirra M, D'hallewin G. 1997. Storage performance of fortune mandarins following hot water dips. Postharvest Biology and Technology 10:229–238.
- 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 indices 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.
- Shewfelt RL.1986. Postharvest treatment for extending the shelf life of fruits and vegetables. Food Technology 40:70-80.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. Journal of Experimental Botany 53(372):1305-19.
- SIAP. 2016. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México D.F.:SAGARPA. Disponible en: http://siap.sagarpa.gob.mx. Consultado el 29 de junio de 2016.
- Sitrit Y, Bennett AB. 1998. Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: a re-examination. Plant Physiology 116:1145–1150.
- Smith CJS, Watson CF, Morris PC, Bird CR, Seymour GB, Gray JE, Arnold C, Tucker GA, Schuch W, Harding S. 1990. Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. Plant Molecular Biology 14:369–379.
- Smith DL, Gross KC. 2000. A family of at least seven betagalactosidase genes is expressed during tomato fruit development. Plant Physiology 123:1173–1183.
- 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 treatments on the quality and antioxidant levels in tomato fruit. Food Science and Technology 38:657–663.
- Spooner DM, Peralta I, Knapp S. 2005. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [SolanumL. section Lycopersicon (Mill.) Wettst.]. International Association for Plant Taxonomy (IAPT) 54:43-61.

- 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.
- Sun W, Xu X, Zhu H, Liu A, Liu L, Li J, Hua X. 2010. Comparative transcriptomic profiling of a salt tolerant wild tomato species and a salt sensitive tomato cultivar. Plant Cell Physiology 51(6):997–1006.
- Sung DY, Kaplan F, Lee KJ, Guy CL. 2003. Acquired tolerance to temperature extremes. Trends in Plant Science 8:179–187.
- Takeoka GR. 2001. Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. Food Chemistry 49:3712-3717.
- Tanksley SD. 2004. The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. The Plant Cell 16:S181–S189.
- The Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. Nature 485:635–41.
- Theologis A, Oeller PW, Wong L, Rottmann WH, Gantz DM. 1993. Use of a tomato mutant constructed with reverse genetics to study fruit ripening, a complex developmental process. Genetics and Development 14:282–295.
- Thomashow MF. 1990. Molecular genetics of cold-acclimation in higher plants. Advances in Genetics 28:99–131.
- Thomashow MF. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology 50:571-599.
- Tigchelaar EC. 2001. Botánica y cultivo. En: Jones JB, Jones JP, Stall RE, Zitter TA Editores. Plagas y enfermedades del tomate. The American Phytopathological Society. Madrid, España: Mundi-Prensa. pp 2-4.
- Timperio AM, Egidi MG, Zolla L. 2008. Proteomics applied abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). Journal of Food Proteomics 71:391-411.

- Torres AM, Rojas LF, Mazo JC, Sampedro C, Restrepo S, Atehortúa, L. 2003. Estudio de medios de cultivo para la síntesis de licopeno a partir de Clavibacter michiganensis sub. Michiganensis. Vitae 10:37-45.
- Traber MG, Sokol RJ, Ringel SP, Neville HE, Thellman CA, Kayden HJ. 1987. Lack of tocopherol in peripheral nerves of vitamin E-deficient patients with peripheral neuropathy. The New England Journal of Medicine 317:262-265.
- Tsaniklidis G, Delis C, Nikoloudakis N, Katinakis P, Aivalakis G. 2014. Low temperature storage affects the ascorbic acid metabolism of cheery tomato fruits. Plant Physiology and Biochemistry 84:149-157.
- UniProt. 2016. UniProtKB US. Uniprot Consortium. Disponible de http://www.uniprot.org/uniprot/K4CBD6. Consultado el 20 de enero de 2016.
- USDA U. S. Department of Agriculture. 2016. USDA National Database for Standard Reference, Release 26. Nutrient Data Laboratory Home Page. Washington DC.: U. S. Derp. of Agriculture. Disponible en: http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl. Consultado el 5 de julio de 2016.
- Valadez LA. 1998. Producción de hortalizas. (1ra. Ed.) México D.F: Limusa. 298 p.
- Valenzuela-Ponce ML. 2016. Evaluación de parámetros fisiológicos e identificación de proteínas asociadas con tolerancia inducida al daño por frío en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Imperial. [Tesis de Maestría]. Culiacán, México: Facultad de Ciencias Químico biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. 141 p.
- Van Meulebroek L, Vanden Bussche J, Steppe K. 2014. High-resolution orbitrap mass spectrometry for the analysis of carotenoids in tomato fruit: validation and comparative evaluation towards UV–VIS and tandem mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 406:2613–2626.
- 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.
- Vianello A, Marci F. 1991.Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide at the surface of plant cells. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 23:409–423.
- Vierling E. 1991. The role of heat shock proteins in plants. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42: 579–620.
- Waliszewski KN, Blasco G. 2010. Propiedades nutraceúticas del licopeno. Salud Publica de México 52:254-265.
- Walker MA, McKersie BD. 1993. Role of the ascorbate–glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. Journal of Plant Physiology 141:234–239.
- Wang CY. 1995. Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase and superoxide dismutase in chilled zucchini squash. Postharvest Biology and Technology 5:67–76.
- 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 y 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, Gerstein M, SnyderM. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews genetics 10:57-63.
- Weiss J, Egea-Cortines M. 2009. Transcriptomic analysis of cold response in tomato fruits identifies dehydrin as a marker of cold stress. Journal of Applied Genetics 50(4):311–319.

- 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.
- 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. 174 p.
- 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.
- Wold AB, Rosendfeld HJ, Holte K, Baugerod H, Blomhoff R y 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.
- Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu JK. 2001. The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress and osmotic stress-responsive gene expression. Plant Cell 13:2063–2083.
- Xu J, Xing XJ, Tian YS, Peng RH, Xue Y, Zhao W. 2015. Transgenic arabidopsis plants expressing tomato glutathione-s-transferase showed enhanced resistance to salt and drought stress. PLoS ONE 10(9):1-16.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1994. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. Plant Cell 6:251–264.
- Yang SF, Hoffman NE. 1984. Ethylene biosysnthesis and its regulation in higher plants. Annual Review of Plant Physiology 35:155-189.
- Yu C, Wang HS, Yang S, Tang XF, Duan M, Meng QW. 2009. Overexpression of endoplasmic reticulum omega-3 fatty acid desaturase gene improves chilling tolerance in tomato. Plant Physiology and Biochemistry 47:1102–1112.
- Zhang X, Guo X, Lei C, Cheng Z, Lin Q, Wang J, Wu F, Wang J, Wan J. 2011a. Overexpression of *SICZFP1*, a novel TFIIIA-type zinc finger protein from tomato,

- confers enhanced cold tolerance in transgenic Arabidopsis and rice. Plant Molecular Biology Reporter 29:185-196.
- 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 X, Shen L, Li F, Zhang Y, Meng D, Sheng J. 2010. Up-regulating arginase 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.
- Zhang YJ, Yang JS, Guo SJ, Meng JJ, Zhang YL, Wan SB, He QW, Li XG. 2011b. Over-expression of the Arabidopsis CBF1 gene improves resistance of tomato leaves to low temperature under low irradiance. Plant Biology 13:362–367.
- Zhao D, Shen L, Fan B, Yu M, Zheng Y, LV Sa, Sheng J. 2009b. Ethylene and cold participate in the regulation of *LeCBF1* gene expression in postharvest tomato fruits. FEBS Letters 583: 3329–3334.
- Zhao DY, Shen L, Fan B, Liu KL, Yu MM, Zheng Y, Ding Y, Sheng JP. 2009a. Physiological and Genetic Properties of Tomato Fruits from 2 Cultivars Differing in Chilling Tolerance at Cold Storage. Journal of Food Science 74(5):C348-52.
- Zhou S, Sauvé RJ, Liu Z, Reddy S, Bhatti S, Hucko Sd, Fish T, Thannhauser TW. 2011. Identification of salt-induced changes in leaf and root proteomes of the wild tomato, solanum chilense. American Society for Horticultural Science 136(4):288–302.
- Zou L, Li H, Ouyang B, Zhang J, Ye Z. 2006. Cloning and maping of genes involved in tomato ascorbic acid biosynthesis and metabolism. Plant Science 170:120-127.

ABREVIATURAS

ACO1 Ácido 1-aminociclopropano carboxílico oxidasa 1

ACS4 Ácido 1-aminociclopropano carboxílico sintasa 4

ADH2 Alcohol deshidrogenasa

ADN Ácido desoxiribonucleico

ADNc Ácido desoxiribonucleico complementario

APX Ascorbato peroxidasa

AOX Oxidasas alternas
ARN Ácido ribonucleico

ARNm Ácido ribonucleico mensajero

AsA Ácido ascórbico

ATT Alcohol acyl transferasa

°C Celcius

CAT Catalasa

CF1 Factor acoplado a la ATP sintasa tilacoidal COR Genes regulados por el frío (Cold regulated)

Cv Cultivar

DF Daño por frío

DHAR Dehidroascorbato reductasa

DXS 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa

Ea Energía de activación

GR-RBP proteína rica en glicina que se une al ARN

GGPP Geranil geranil pirofosfato

GPX Glutatión peroxidasa
GR Glutatión reductasa
CRTISO Carotenoide simerasa

Grx Glutaredoxina

GSH Glutatión

GST Glutatión-s-transferasa

H Hora

Ha Hectárea

HSP Proteína de choque térmico (Heat shock protein)

HTC1 tolerancia al daño por frío inducida por calor

IDF Índice de daño por frío

LE Lixiviación de electrolitos

LeCBF Factor de unión a repetidos de C en tomate (C-repeat factor

binding)

LeETR3 Proteína receptora de etileno 3 de tomate

LeETR4 Proteína receptora de etinelo 4 de tomate

LeICE Inductor de la expresisón de CBF

LOX Lipoxigenasa

β-MPP subunidad II del complejo citocromo c reductasa/peptidasa de

procesamiento mitocondrial subunidad alfa

β-MPP subunidad II del complejo citocromo c reductasa/peptidasa de

procesamiento mitocondrial subunidad beta

MDA Malondialdehido

MDHAR Monodehidroascorbato reductasa

N Newton

NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NR Proteína receptora de etileno (Non-Ripening)

PG Poligalacturonasa

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PME Pectil metil esterasa

POD Peroxidasa

PR Proteína relacionada con la patogénesis

PRX Peroxiredoxinas

PSII Fotosístema II

PSY-1 Fitoeno sintasa 1
PSY-2 Fitoeno sintasa 2

ROS Especies reactivas de oxígeno

SOD Superóxido dismutasa

STH Sin tratamiento hidrotérmico

TH Tratamiento hidrotérmico

Ton Tonelada

TDF Temperatura de daño por frío

TPI Triosa fosfato isomerasaTPX1 Thioredoxin peroxidasa 1

TR Temperatura de refrigeración

UBI3 Ubiquitina 3 UV Ultravioleta

XI Xilosa isomerasa