

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

**Participación del ácido ascórbico en la transición de
cloroplastos a cromoplastos durante la maduración de
frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**

Tesis presentada para optar al título de Doctora en Ciencias Naturales

Licenciada María Charlotte Steelheart Molina

Directores:

Dr. Carlos Guillermo Bartoli

Dr. Gustavo Esteban Gergoff Grozeff

El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctora en Ciencias Naturales, fue realizado en el Instituto de Fisiología Vegetal de La Plata (INFIVE) CONICET – UNLP, bajo la dirección de los Doctores Carlos Guillermo Bartoli y Gustavo Esteban Gergoff Grozeff.

La Plata, Buenos Aires, 2022.

PUBLICACIONES

Trabajos inherentes al plan de tesis publicados en revistas internacionales con referato:

-**Steelheart C**, Alegre ML, Baldet P, Rothan C, Bres C, Just D, Yoshihiro O, Hiroshi E, Ganganelli I, Gergoff Grozeff GE, Bartoli CG (2022) High light stress induces H₂O₂ production and accelerates fruit ripening in tomato. *Plant Science*, 111348.

-**Steelheart C**, Alegre ML, Baldet P, Rothan C, Bres C, Just D, Okabe Y, Ezura H, Ganganelli I, Gergoff Grozeff GE, Bartoli CG (2020) The effect of low ascorbic acid content on tomato fruit ripening. *Planta* 252:36.

-**Steelheart C**, Alegre ML, Vera Bahimaa J, Senn ME, Simontacchi M, Bartoli CG, Gergoff Grozeff GE (2019) Nitric oxide improves the effect of 1-methylcyclopropene extending the tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit postharvest life. *Scientia Horticulturae*, 255: 193-201.

Trabajos inherentes al plan de tesis publicados en congresos o jornadas:

-**Steelheart C**, Alegre M, Baldet P, Rothan C, Just D, Brès C, Gergoff Grozeff GE, Bartoli CG. Ethylene regulates H₂O₂ production during tomato fruit ripening. XVI Latin American Congress of Plant Physiology and XXXII Argentine Meeting of Plant Physiology. Virtual Edition 09/2021.

-**Steelheart C**, Alegre M, Baldet P, Rothan C, Just D, Brès C, Gergoff Grozeff GE, Bartoli CG. The participation of oxidative stress in chloroplast-chromoplast transition. XV Latin American Congress of Plant Physiology and XXXII Argentine Meeting of Plant Physiology. Córdoba-Argentina. 11/2018.

Dedico esta tesis a mi compañero de vida Iván
y a mi adorado hijo Pedro

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de La Plata y al Comité Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por permitirme acceder y financiar mis estudios postgrado.

A mis directores, a Carlos Bartoli por concederme la beca y confiar en mí para llevar a cabo tu idea del proyecto, brindándome una gran oportunidad de vida y a Gustavo Gergoff, porque desde el primer día me apoyaste y enseñaste todo lo que se ahora sobre el trabajo de laboratorio y darme la oportunidad de participar en diferentes trabajos. A ambos también les agradezco todo el apoyo personal que representaron para mí y mi familia.

A mi flaco Iván, por estos diez años de apoyo incondicional, siempre creyendo en mí y siendo mi soporte. Gracias por estar ahí ayudándome con mis plantas, midiendo, cortando, acompañándome y sobre todo escuchándome cada vez que te necesité.

A mi hijito Pedro, porque desde la pancita ya estas siendo paciente con tu mamá mientras ella trabaja para darte un mejor futuro.

A mi sobrina Melissa, mi niña grande, siendo mi primera admiradora eres mi motivo para ser mejor y darte el mejor ejemplo. Si de grande sigues queriendo ser científica, aquí estará la tía para apoyarte.

A mi familia, mi mamá (Ninamamita), mi hermana Hilde y mi cuñado Julio por todo el apoyo y cariño brindado.

A todos los compañeros del Lab. C. y del INFIVE. Por todas esas charlas y ayudas que a lo largo de los años se transformaron en lindas amistades. En especial a Matías L., gracias por ese trabajo codo a codo tan valioso que permitió que esta tesis se diera sin complicaciones.

A la Argentina y su hermosa gente, siempre dispuestas a incluirme y hacerme sentir bienvenida, a darme igualdad de oportunidades a mí y a todos los venezolanos. Mil gracias.

ÍNDICE

<i>PUBLICACIONES</i>	3
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	5
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	10
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	13
<i>ABREVIATURAS</i>	14
<i>RESUMEN</i>	19
<i>ABSTRACT</i>	22
La planta de tomate	26
El fruto del tomate	26
El cambio de color del fruto	27
Control molecular y bioquímico del cambio de color del fruto	28
Importancia económica del fruto.....	30
Calidad del fruto.....	30
Las especies reactivas del oxígeno	31
Fuentes celulares de producción de ROS.....	32
Mecanismos endógenos de protección contra ROS	33
El papel de las ROS en la señalización en plantas	33
El Ácido ascórbico	34
Biosíntesis del AA	34
Funciones del AA.....	34
El AA como antioxidante ante estrés oxidativo por generación de ROS	35
Deficiencia de AA en plantas de tomate	36
Las ROS y el AA durante la maduración del fruto de tomate.....	37
Definición del problema.....	38
Hipótesis y objetivos	39
Objetivo específico 1.....	39
Objetivo específico 2.....	39
Objetivo específico 3.....	40
Objetivo específico 4.....	40
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	41
Material vegetal	42
Tratamientos	42
Suplementación de AA y H ₂ O ₂	43
Suplementación con ACC y 1-MCP	43

Suplementación de alta irradiancia.....	43
Sólidos solubles, pH y acidez titulable	44
Tasa respiratoria.....	44
Textura	44
Clorofila y carotenoides	44
Tiempo de maduración	45
Evaluación de la respuesta fotosintética	45
Tasas de transporte de electrones (ETR).....	45
“Quenching” no fotoquímico (NPQ).....	46
Eficiencia del PSII (Fv/Fm)	46
Determinación de especies reactivas del oxígeno	46
Detección subcelular de ROS	46
Determinación de las peroxidación lipídica	47
Determinación del contenido de antioxidantes no enzimáticos	47
AA y dehidroascorbato.....	47
Glutatión total y oxidado	48
Determinación de actividad enzimática.....	48
Contenido de proteínas.....	48
Actividad de catalasa (CAT)	49
Actividad de peroxidasas (PX)	49
Actividad de ascorbato peroxidasa (APX)	49
Actividad de superóxido dismutasa (SOD)	49
Actividad de NADPH oxidasa (NOX)	49
Determinación de la expresión de genes.....	50
Diseño de cebadores	50
Extracción de RNA total.....	50
Transcripción reversa	51
PCR en tiempo real.....	52
Análisis estadístico	52
RESULTADOS	53
<i>CAPITULO I. EFECTO DEL BAJO CONTENIDO DE AA PRESENTE EN PLANTAS DE TOMATE MUTANTES DEFICIENTES EN GDP-L-GALACTOSA FOSFORILASA EN LA CALIDAD DEL FRUTO DURANTE LA MADURACIÓN.....</i>	54
Antecedentes específicos.....	55
Resultados	56
Contenido de ácido ascórbico y su estado rédox en frutos silvestres y mutantes deficientes de ácido ascórbico durante la maduración	56

Efecto de la deficiencia de ácido ascórbico sobre la acumulación de pigmentos y el tiempo de maduración	57
Efectos de la deficiencia de ácido ascórbico en los parámetros de calidad del fruto durante la maduración.....	59
Discusión	61
<i>CAPITULO II. EFECTO DE TRATAMIENTOS CON AA Y H₂O₂ EN LA VELOCIDAD DE MADURACIÓN DE FRUTOS DE PLANTAS DE TOMATE MUTANTES DEFICIENTES EN GDP-L-GALACTOSA FOSFORILASA CON BAJO CONTENIDO DE AA.</i>	
Antecedentes específicos.....	66
Resultados	68
Efecto del ácido ascórbico y el H ₂ O ₂ sobre el tiempo de maduración	68
Concentración de ácido ascórbico y glutatión y su estado redox durante la maduración del fruto.....	68
Metabolismo del H ₂ O ₂ durante la maduración de frutos de tomate deficientes en ácido ascórbico	71
Discusión	78
<i>CAPITULO III. EFECTO DEL BAJO CONTENIDO DE AA EN LA MADURACIÓN MODULADA POR ETILENO DE FRUTOS DE PLANTAS DE TOMATE MUTANTES DEFICIENTES EN GDP-L-GALACTOSA FOSFORILASA.</i>	
Antecedentes específicos.....	83
Resultados	85
Efectos del ACC y 1-MCP durante la maduración de frutos deficientes de ácido ascórbico	85
Efectos del ACC y 1-MCP en el contenido de antioxidantes durante la maduración de frutos deficientes de ácido ascórbico	85
Efectos del ACC y 1-MCP en la producción de ROS (H ₂ O ₂) y daño a lípidos durante la maduración de frutos deficientes de ácido ascórbico	87
Discusión	89
<i>CAPITULO IV. EFECTO DEL ESTRÉS INDUCIDO POR ALTAS IRRADIANCIAS EN LA MADURACIÓN DE FRUTOS DE PLANTAS DE TOMATE MUTANTES DEFICIENTES EN GDP-L-GALACTOSA FOSFORILASA CON BAJO CONTENIDO DE AA.</i>	
Antecedentes específicos.....	94
Resultados	97
Temperatura de frutos con bajo contenido de ácido ascórbico expuestos a alta irradiancia	97
Efecto de la alta irradiancia y temperatura en la fotosíntesis de frutos con bajo contenido de ácido ascórbico.....	98
Efecto de la alta irradiancia y temperatura en el tiempo de maduración de frutos deficientes de ácido ascórbico	100

Respuesta antioxidante de frutos con bajo contenido de ácido ascórbico expuestos a alta irradiancia y temperatura durante la maduración.....	100
Expresión de genes asociados con estrés oxidativo y maduración de frutos deficientes en ácido ascórbico.....	104
Discusión	110
<i>CONCLUSIONES</i>	113
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	116

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Desarrollo y maduración de frutos de tomate.....	27
Figura 2. Cambio de color durante la maduración de frutos de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> cv Micro Tom).....	27
Figura 3. Representación esquemática del proceso de maduración en el fruto del tomate mediada por etileno.....	29
Figura 4. El ciclo agua-agua y el sistema antioxidante implicado en la captación de ROS en los cloroplastos.....	36
Figura 5. Plantas de tomate micro-Tom silvestres (a) y mutantes <i>Slppg1</i> (b y c).....	37
Figura 6. Influencia hormonal durante el crecimiento / maduración del fruto y la interacción con NO, H ₂ O ₂ y antioxidantes.....	38

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 7. Cebadores empleados en la cuantificación por PCR tiempo real.....	50
Figura 8. Gel de agarosa al 1% corrido por 45 min a 70 V.....	51

CAPÍTULO I

Figura 9. Contenido de ácido ascórbico y estado redox (%) en frutos silvestres (WT) y mutantes <i>Slggp1</i> (GGP-5261 y GGP-49C12), en cuatro estadios de maduración.....	57
Figura 10. Contenido de pigmentos en frutos de plantas (WT) y mutantes <i>Slggp1</i> (GGP-5261 y GGP-49C12), en cuatro estadios de maduración.....	58
Figura 11. Tasa respiratoria (TR) y firmeza frutos silvestres (WT) y mutantes <i>Slggp1</i> (GGP-5261 y GGP-49C12), durante la maduración.....	59
Figura 12. pH, sólidos solubles (TSS), acidez titulables (ATT) y ratio en frutos WT y mutantes <i>Slggp1</i> (GGP-5261 y GGP-49C12), durante la maduración.....	60

CAPÍTULO II

Figura 13. Contenido de ácido ascórbico y estado redox (%) en tratamientos control (a) 20 mM ácido ascórbico (b) y 10 mM H ₂ O ₂ (c) de los tres genotipos analizados.....	69
Figura 14. Contenido de glutatión y estado redox (%) en control (a) 20 mM ácido ascórbico (b) y 10 mM H ₂ O ₂ (c), de los tres genotipos analizados.....	70

Figura 15. Producción de H ₂ O ₂ en el fruto en tratamientos control (a), 20 mM ácido ascórbico (b) y 10 mM H ₂ O ₂ (c), de los tres genotipos analizados.	71
Figura 16. Tejidos de pericarpio de tomate en estadio BR analizados por microscopía confocal.	72
Figura 17. Peroxidación lipídica medida como contenido de MDA en tratamientos control (a), 20 mM ácido ascórbico (b) y 10 mM H ₂ O ₂ (c), de los tres genotipos analizados.....	73
Figura 18. Actividad de NOX y SOD en frutos silvestres y mutantes <i>Slgpp1</i> en el tratamiento control (a, d), 20 mM ácido ascórbico (b, e) y 10 mM H ₂ O ₂ (c, f).	75
Figura 19. Actividad de CAT, APX y PX en frutos silvestres y mutantes <i>Slgpp1</i> en el tratamiento control (a, d y g), 20 mM ácido ascórbico (b, e y h) y 10 mM H ₂ O ₂ (c, f e i).	77

CAPÍTULO III

Figura 20. Contenido de ácido ascórbico total y porcentaje de DHA (%) en frutos de tratamientos control ACC (a), 0,5 mM ACC (b) y control 1-MCP (c) y 8 ppm 1-MCP (d).	86
Figura 21. Contenido de glutatión total y porcentaje de glutatión oxidado (%) en frutos de tratamientos control ACC (a), 0,5 mM ACC (b) y control 1-MCP (c) y 8 ppm 1-MCP (d).	87
Figura 22. Contenido de H ₂ O ₂ en frutos de tratamientos control ACC (a), 0,5 mM ACC (b) y control 1-MCP (c) y 8 ppm 1-MCP (d).	88
Figura 23. Peroxidación lipídica medida como contenido de MDA en frutos de tratamientos control ACC (a) 0,5 mM ACC (b) y control 1-MCP (c) y 8 ppm 1-MCP (d).	89

CAPÍTULO IV

Figura 24. Temperatura de frutos expuesto a GI (a) y expuestos HI (b).	98
Figura 25. Contenido de ácido ascórbico total y porcentaje de oxidado (%) en frutos crecidos en GI (a) y HI (b). Contenido de glutatión total y porcentaje de glutatión oxidado (%) en frutos crecidos en GI (c) y HI (d).	101
Figura 26. Cambios en la actividad de CAT, en frutos crecidos en GI (a) y HI (b). Cambios en la actividad de APX en frutos en GI (c) y HI (d).	102
Figura 27. Producción de H ₂ O ₂ en frutos crecidos en GI (a) y HI (b). Peroxidación en frutos crecidos en GI (c) y HI (d).	103
Figura 28. Expresión relativa (RE) de <i>JBU1</i> en frutos crecidos en GI (a) y HI (b) y de <i>DREB1</i> en frutos crecidos en GI (c) y HI (d), analizados por RT-PCR cuantitativa.....	105

Figura 29. Expresión relativa (RE) de *HSP17.6* en frutos crecidos en GI (a) y HI (b), de *HSP20.0* en frutos crecidos en GI (c) y HI (d), y de *HSP20.1* en frutos crecidos en GI (e) y HI (f), analizados por RT-PCR cuantitativa. 107

Figura 30. Expresión relativa (RE) de *ACS6* en frutos crecidos en GI (a) y HI (b), de *ACO4* en frutos crecidos en GI (c) y HI (d), y de *ETR3* en frutos crecidos en GI (e) y HI (f), analizados por RT-PCR cuantitativa. 109

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Principales especies reactivas del oxígeno (ROS).....	32
--	----

CAPÍTULO I

Tabla 2. Número de días para observar 50% de frutos rojos maduros (RR) plantas silvestres y mutantes <i>Slgpp1</i>	59
--	----

CAPÍTULO II

Tabla 3. Número de días para observar 50% de frutos rojos maduros en plantas silvestres y mutantes <i>Slgpp1</i> (mutantes GGP-5261 y GGP-49C12), en tratamientos control, 20 mM ácido ascórbico (AA) y 10 mM H ₂ O ₂	68
---	----

CAPÍTULO III

Tabla 4. Número de días para observar 50% de frutos rojos maduros en silvestres y mutantes <i>Slgpp1</i> (GGP-5261 y GGP-49C12) en tratamientos control, 0,5 mM ACC y control, 8ppm 1MCP.	85
--	----

CAPÍTULO IV

Tabla 5. Temperatura (°C) atmosférica de los frutos (promedio de frutos de los 4 estadios de maduración analizados), en tratamientos GI y HI.....	97
Tabla 6. Tasa de transporte de electrones (ETR), eficiencia máxima del PSII (F _v / F _m) y “quenching” no fotoquímico (NPQ) en frutos de dos estadios de maduración (MG y BR), crecidos en GI y HI.	99
Tabla 7. Número de días para observar 50% de frutos rojos maduros silvestres y mutantes <i>Slgpp1</i> en GI, y HI.	100

ABREVIATURAS

1-MCP 1-metilciclopropeno

$^1\text{O}_2$ el oxígeno singlete

A adenina

AA ácido ascórbico

ABA ácido abscísico

ACC 1-aminociclopropano-1-carboxilato

ACO 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa

ACO1 gen *1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE OXIDASE 1*

ACO3 gen *1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE OXIDASE 3*

ACO4 gen *1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE OXIDASE 4*

ACO5 gen *1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE OXIDASE 5*

ACS1 gen *1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 1*

ACS2 gen *1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 2*

ACS4 gen *1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 4*

ACS6 gen *1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 6*

ADN ácido desoxirribonucleico

ADNc ácido desoxirribonucleico complementario

A_{\max} asimilación máxima

ANOVA análisis de la varianza

APX ascorbato peroxidasa

ARN ácido ribonucleico

ARNm ácido ribonucleico mensajero

ATP adenosín trifosfato

ATT acidez total titulable

AUX auxinas

BR del inglés breaker (virado)

C control

CAT catalasa

CTR1 receptor de etileno. Del inglés "Constitutive Triple Response"

CYT citoquininas

cyt1 mutantes de *Arabidopsis* deficientes en GDP-D-manosa pirofosforilasa

DCFDA diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína

DHAR dehidroascorbato reductasa

DEPC dietilpirocarbonato

DHA ácido dehidroascórbico

dNTPs nucleósidos trifosfatos

DREB1 gen *DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 1*

DTNB del inglés 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)

DTT ditritiotreitol

EDTA ácido etilendiaminotetraacético

EIL factor de transcripción. Del inglés "ethylene insensitive 3-like"

EIN1/2/3 factor de transcripción. Del inglés "Ethylene insensitive"

em emisión

ET etileno

ETR tasa de transporte de electrones

ETR2 gen que codifica receptor de etileno

ETR3 gen que codifica receptor de etileno

ETR4 gen que codifica receptor de etileno

ETR6 gen que codifica receptor de etileno

ETR Receptores de etileno, del inglés "Ethylene Resistant"

ex extinción

FAOSTAT base de datos estadísticos corporativos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación

Fig figura

Fm fluorescencia máxima

Fv coeficiente de fluorescencia variable

Fv/Fm eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II.

GMP GDP-D-manosa pirofosforilasa.

GGP GDP-L-galactosa fosforilasa

GGP-49C12 mutante de tomate deficiente en GDP-L-galactosa fosforilasa 1

GGP-5261 mutante de tomate deficiente en GDP-L-galactosa fosforilasa 1

GI irradiancia de invernadero

GIB giberelinas

GLDH L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa

GME GDP-d-manosa epimerasa

GPP L-galactosa-1- fosfato fosfatasa

GPX glutatión peroxidasa

GR glutatión reductasa

Grx glutarredoxina

GSH glutatión

GSSG glutatión oxidado

H hora

HI Irradiancia del exterior del invernadero

HPLC cromatografía líquida de alta presión

IMG fruta verde inmadura

JUB1 gen *JUBGBRUNNEN1*

LR del inglés light red (rojo)

MDA malondialdehído

MDHA ácido mono dehidroascorbico

MDHAR monodehidroascorbato reductasa

MG del inglés mature green (verde maduro)

Micro-Tom variedad de tomate

min minutos

M-MLV del inglés moloney murine leukemia virus reverse transcriptase

NACC1 gen *Nucleus accumbens-associated protein 1*

NADP+ nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado

NADPH nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

Nor mutantes para el gen *NOR*

NOR gen “non ripening”

NOX NADPH oxidasa

NPQ “Quenching” no fotoquímico O_2^- anión superóxido

O_2^* - oxígeno singulete

PAR radiación fotosintéticamente activa

PCR amplificación en cadena por la ADN polimerasa

PF peso fresco

pH potencial de hidrógeno

PII fotosistema II

PMSF fenilmetilsulfonilo

Prx peroxiredoxinas

PSI fotosistema I

rin mutante para *RIN*

RIN gen “Ripening Inhibitor”

ROS del inglés Reactive oxygen species

RR del inglés red ripe (rojo maduro)

RT-qPCR amplificación en cadena por la ADN polimerasa en tiempo real

sHSP pequeñas proteínas de choque térmico

SlGGP1 gen de tomate que codifica la enzima GDP-L-galactosa fosforilasa 1

Slgpp1 mutantes GGP-5261 y GGP-49C12 deficientes en GDP-L-galactosa fosforilasa 1

SlGGP2 gen de tomate que codifica la isoenzima GDP-L-galactosa fosforilasa 1.

SlHSP17.6 gen para pequeña proteína de choque térmico

SlHSP20.0 gen para pequeña proteína de choque térmico

SIHSP20.1 gen para pequeña proteína de choque térmico

SOD superóxido dismutasa

Srx sulfurodoxinas

TFA ácido trifluoracético

TILLING del inglés Targeting Induced Local Lesions IN Genomes

TR tasa respiratoria

Trx tiorredoxinas

TSS sólidos solubles

UT tiempo Universal

UV ultravioleta

vct1 mutante de GDP-L-galactosa fosforilasa 1

vct2 mutante de GDP-L-galactosa fosforilasa 1

vct5 mutante de GDP-L-galactosa fosforilasa 1

vct4 mutante de GDP-L-galactosa fosforilasa 1

vct del inglés vitamin C deficient. Mutante de *Arabidopsis* deficiente en ácido ascórbico.

VTC2 gen de *Arabidopsis* que codifica la isoenzima GDP-L-galactosa fosforilasa 1.

vct2-vct5 doble mutante de *Arabidopsis* deficiente en las dos isoenzimas GDP-L galactosa fosforilasa

WT genotipo silvestre

RESUMEN

La maduración del fruto del tomate es un proceso altamente coordinado que involucra el cambio de color verde a rojo durante la transformación de cloroplastos a cromoplastos. Esta transformación está asociada con el desmantelamiento de la maquinaria fotosintética y la acumulación de carotenoides en los cromoplastos y de azúcares, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos volátiles en las células que determinan la calidad del fruto. A pesar de que es controversial si la actividad fotosintética que realiza el fruto verde contribuye a la acumulación de biomasa y calidad del fruto, es posible que las funciones de los cloroplastos sean importantes determinando ciertas características como, por ejemplo, la capacidad de sintetizar y acumular antioxidantes como el ácido ascórbico (AA).

El AA es un ácido orgánico y principal antioxidante presente en las células vegetales. Su función es la eliminación de especies reactivas del oxígeno (ROS), y se ha identificado como molécula señal en numerosos procesos como el desarrollo de los frutos y durante la respuestas al estrés. Por otro lado, las ROS fueron inicialmente reconocidas como subproductos tóxicos del metabolismo aeróbico. Sin embargo, diferentes estudios reconocen el papel de las ROS integrando señales genéticas y externas para promover el desarrollo y la adaptación ambiental. Dos líneas mutantes para la GGP en plantas de tomates (mutantes *Slggp1*), con menor contenido de AA permitieron estudiar en esta tesis la conexión de las vías de biosíntesis del AA y el metabolismo antioxidante en el cambio de color y el desarrollo de la calidad del fruto durante la maduración.

Se determinó el contenido de antioxidantes en cuatro estadios de maduración durante el cambio de color (GM, BR, OR y RR). Se observó que el contenido de AA total en los frutos mutantes *Slggp1* es aproximadamente un 30% del AA presente en frutos silvestres en los cuatro estadios de maduración analizados. Por otro lado, mientras que en los frutos silvestres el porcentaje de ácido ascórbico oxidado (DHA) disminuye durante la maduración, en frutos mutantes *Slggp1* se mantiene constante. Además, se observó que el contenido de glutatión en frutos mutantes *Slggp1* es mayor que en frutos silvestres y menor porcentaje de glutatión oxidado durante la maduración. Asimismo, se observó que los frutos mutantes *Slggp1* presentan mayor contenido de clorofila y carotenoides, y un retraso en el tiempo de maduración, medido como el número de días que tardan para cambiar de color verde a rojo, en comparación con los frutos silvestres. El análisis de los parámetros de calidad permitió observar que los frutos mutantes *Slggp1* son más firmes en el estadio rojo en comparación con los frutos silvestres, mientras que el contenido de sólidos solubles y la acidez aumentaron durante la maduración en

los tres genotipos analizados, sin embargo, al observarse menor acidez, el ratio fue mayor en frutos mutantes *Slgpp1*.

Para determinar el papel del AA durante la maduración, se realizaron tratamientos con AA (20 mM) y H₂O₂ (10 mM), en los cuatro estadios de maduración analizados. El tratamiento con AA aumentó el contenido de AA y reestableció el tiempo de maduración en frutos mutantes *Slgpp1*, mientras que el tratamiento con H₂O₂ no afectó el contenido de AA, pero retrasó la maduración de los tres genotipos analizados. Se observó un aumento en la producción de H₂O₂ en los estadios de transición BR y OR sólo en frutos silvestres, mientras que la mayor producción de H₂O₂ coincide con la localización de la clorofila, demostrando que la producción se concentra en los cloroplastos. Inesperadamente, la suplementación con AA provocó un aumento en la producción de H₂O₂, en los primeros estadios de maduración de frutos mutantes *Slgpp1*. Mientras que el tratamiento con H₂O₂ provocó una disminución de su propia producción en los primeros estadios de la transición en los tres genotipos analizados. En frutos no tratado, la actividad de enzimas generadoras de ROS (NADPH oxidasa y superóxido dismutasa), aumentó durante la transición sólo en frutos silvestres, resultados que están relacionado con la producción de H₂O₂ observada, mientras que la actividad de enzimas antioxidantes permitió establecer que frutos mutantes *Slgpp1* además de presentar mayor contenido de glutatión presentan mayor actividad de catalasa y peroxidasa que pueden evitar el pico de acumulación de H₂O₂ observado en frutos silvestres. Sin embargo, no se observó un vínculo entre el contenido de MDA y la producción de H₂O₂, ni con los estados redox de los antioxidantes y los cambios en el tiempo de maduración.

Para probar la vinculación del metabolismo oxidativo con la maduración modulada por el etileno, frutos silvestres y mutantes *Slgpp1* fueron tratados con 1,5 mM de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) o con 8 ppm de 1-metilciclopropeno (1-MCP), durante el cambio de color. El análisis de antioxidantes determinó que el ACC afecta el contenido de AA sólo de frutos silvestres, mientras que el 1-MCP disminuye el contenido de AA sólo a frutos mutantes *Slgpp1*. A diferencia de lo observado con el contenido de AA, los tratamientos de ACC y 1-MCP disminuyen el contenido de glutatión total sólo de ambos mutantes *Slgpp1*. El análisis del tiempo de maduración determinó que el tratamiento con ACC adelanta la maduración de los tres genotipos analizados, sin embargo, no reestablece el tiempo de maduración de los frutos mutantes *Slgpp1* al tiempo observado en frutos silvestres, mientras que el tratamiento de 1-MCP retrasó de igual manera el tiempo de maduración de los frutos de los tres genotipos analizados. Se observó que el tratamiento con ACC produce un gran aumento de la producción

de H₂O₂ en los primeros estadios de maduración, mientras que el 1-MCP los reduce drásticamente en los tres genotipos analizados, sin daño a lípidos.

Para establecer la actividad fotosintética del fruto y para estimular la síntesis de H₂O₂ derivada de la fotosíntesis, plantas con frutos en estadio verde fueron sacadas del invernáculo para ser expuestas a alta irradiancia (HI). Se observó el aumento en los parámetros fotosintéticos (ETR, F_v/F_m), y el NPQ en frutos de los dos primeros estadios de maduración de los tres genotipos analizados. Se observó que el tratamiento por (HI), redujo el tiempo de maduración y aumentó la producción de H₂O₂, sin daño a lípidos en los tres genotipos analizados. A partir de análisis de la expresión de genes relacionados a la producción de H₂O₂ y la maduración modulada por etileno (*DREB1*, *JNBU1*, *HSP17.6*, *HSP20.1* y *HSP20.1*, *ACO4* y *ACS6*, *ETR*), se observó la participación de estas ROS durante la maduración del fruto desencadenada por condiciones estresantes.

El análisis del tiempo de maduración, el metabolismo antioxidante, la producción de H₂O₂, junto con diferentes tratamientos exógenos y el análisis de expresión de genes de plantas de tomate deficientes en AA como producto de la mutación de *GGP1*, permitieron aportar resultados que establecen el papel del AA modulando el metabolismo redox generado durante la transición de cloroplasto a cromoplastos. Además, el aumento en la producción de H₂O₂, sin daño a lípidos y relacionada con el adelanto en el tiempo de maduración refuerza la evidencia de que el H₂O₂ en sí mismo representa una señal involucrada en maduración.

ABSTRACT

The ripening of tomato fruit is a highly coordinated process and involves the color change from green to red during the chloroplasts to chromoplasts transition. This transition is related with the dismantling of the photosynthetic apparatus and the accumulation of carotenoids in the chromoplasts, sugars, organic acids, volatile aromatic compounds within the cells that ultimately determine fruit quality. Although it is controversial whether fruit photosynthesis contributes to the final biomass and quality, it is possible that the function of the chloroplasts would be important to certain fruit characteristics as the biosynthesis and accumulation of antioxidants (ie. ascorbic acid).

Ascorbic acid (AA) is one of the main antioxidants in plant cells. One of its main functions is the elimination of reactive oxygen species (ROS), and it has also been identified as a signaling molecule in different processes like fruit development and abiotic stress responses. In another hand, the ROS were initially established as toxic sub products from the aerobic metabolism. However, different studies identified the role of ROS integrating genetic, epigenetic, hormonal, and environmental signals during plant development. Two mutant lines for GGP in tomato plants (*Slgpp1* mutants), with low ascorbic acid content, allowed us to study in this thesis the association between ascorbic acid biosynthesis, antioxidant metabolism color change and quality during the fruit development.

Antioxidants content was measured at four ripening stages (GM, BR, OR and RR), during color change. AA total content in *Slgpp1* mutant fruit was 30% of the AA present in wild type (WT) tomato at the four stages analyzed. The percentage of oxidized ascorbic acid (%DHA) in WT fruit decreased along ripening as opposed to *Slgpp1* mutants in which it remained unchanged. Instead, glutathione content was higher in the *Slgpp1* mutant than in the WT and showed lower percentage of oxidation. With regards to pigment content the *Slgpp1* mutant fruits have a higher level of chlorophyll and carotenoids. Moreover, the mutants showed a delay in the ripening time, measured as the number of days required to change from green to red, compared WT fruit. The analysis of other quality parameters showed that at the red stage the *Slgpp1* mutant fruit was firmer than the wild type, while both soluble solids and acidity increased during ripening in the three genotypes analyzed. *Slgpp1* mutant were less acidic and presented then higher soluble sugars acid ratio.

To further characterize the role of ascorbic acid during ripening, AA and H₂O₂ treatments were carried out in the four ripening stages analyzed. Treatment with ascorbic acid increased ascorbic acid content and restored ripening time in *Slgpp1* mutant. Treatment with H₂O₂ did not affect

AA content and delayed ripening in all three genotypes analyzed. An increase in the production of H₂O₂ during the transition was observed only in WT fruit, while the production of H₂O₂ coincides with chlorophyll localization. Unexpectedly, AA supplementation increased in the production of H₂O₂, during the initial ripening stages in *Slgpp1* mutant fruit. Instead, treatment with H₂O₂ decreased its biosynthesis at the green to red transition for the three genotypes analyzed. The activity of NADPH oxidase and superoxide dismutase (ROS-generating enzymes), increased during the color transition only in WT fruit in line with H₂O₂ production, while the activity of antioxidant enzymes allowed to establish that *Slgpp1* mutant fruit, in addition to presenting a higher glutathione content, had higher catalase and peroxidase activity and prevent H₂O₂. No link was observed between MDA content and H₂O₂ production, nor with antioxidant redox states and changes during ripening.

To test the link between oxidative metabolism and ethylene-modulated ripening, WT and *Slgpp1* mutant were treated with ACC (0,5 mM) or 1-MCP (8 ppm). Antioxidant analysis during ripening determined that ACC affected AA content only in WT fruits, while 1-MCP decreased ascorbic acid content in *Slgpp1* mutant fruits. Differently to what was observed with AA, the ACC and 1-MCP treatments decreased the total glutathione content only in *Slgpp1* mutants. Treatment with ACC advanced ripening in the three genotypes analyzed but did not restore the ripening time in the *Slgpp1* mutant. 1-MCP treatment delayed to the same extent the ripening time in the three genotypes analyzed. Treatment with ACC produced a large increase in H₂O₂ production in the early stages of ripening, while 1-MCP drastically reduced it the three genotypes analyzed. While the alteration of the production of H₂O₂ induced by treatments with ACC or 1-MCP does not produce a significant change MDA content.

To establish the photosynthetic on fruit and to stimulate the synthesis of H₂O₂ derived from photosynthesis, plants with green-stage fruit were exposed to high irradiance (HI). Increases in photosynthetic parameters (ETR, Fv/Fm), and NPQ were observed in fruits of the first two stages of ripening in the three genotypes analyzed. The HI treatment reduced the ripening time and increased the production of H₂O₂, without inducing the production of MDA in the three genotypes analyzed. From analysis of the expression of genes related to H₂O₂ production and ripening (*DREB1*, *JNBU1*, *HSP17.6*, *HSP20.1*, *HSP20.1*, *ACO4*, *ACS6* and *ETR3*), the participation of this ROS was observed during fruit ripening triggered by stressful conditions.

The analysis of the ripening time, the antioxidant metabolism, the production of H₂O₂, together with different chemical treatments and the analysis of the expression of genes of tomato plants deficient in ascorbic acid as a product of the *GGP1* mutation, allowed us to improve our

understanding of the role of AA in the redox metabolism generated during the transition from chloroplast to chromoplast. In addition, the increase in the production of H₂O₂, without damage to lipids and related to the advance in the ripening time, reinforces the evidence that H₂O₂ itself represents a signal involved in ripening.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La planta de tomate

El origen de las especies de tomate se localiza en la región andina comprendida entre el sur de Colombia y el norte de Chile, incluyendo las Islas Galápagos. Según Esquinas-Alcázar y Núñez (1995), su domesticación ocurrió en México a partir de *S. lycopersicum*, y los primeros cultivares se crearon a partir de la variante “cerasiforme”, que crece de manera silvestre en regiones tropicales y subtropicales de América.

La taxonomía del tomate ha sufrido cambios a través del tiempo, originalmente el tomate fue clasificado como *Solanum lycopersicum* por Linneo, después fue reclasificado por Miller (1754) como *Lycopersicon esculentum*. En la actualidad el tomate se clasifica como *Solanum lycopersicum*, L. (Child 1990; Peralta y col., 2008).

La planta de tomate es perenne y de porte arbustivo, pero se cultiva como anual. Puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta y de crecimiento determinado o indeterminado (Chamorro, 1995). El tomate posee un sistema radicular con una raíz principal (corta y débil), con raíces secundarias y adventicias. Posee un tallo principal de 2-4 cm de grosor que consta de epidermis, corteza o córtex, cilindro vascular y tejido medular. Sus hojas son compuestas, con 7 a 9 folíolos peciolados, de disposición alterna, con bordes dentados y recubiertos de pelos glandulares. Las flores presentan ovario súpero con 5 o más sépalos, e igual número de pétalos de color amarillo. Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racimoso (vara floral), generalmente en número de 3 a 10 (Peralta y col., 2008).

El fruto del tomate

El órgano comercial es el fruto, el cual constituye una baya con gran diversidad de tamaños y formas, generalmente de color rojo, bilocular o multilocular que pueden variar desde 1,5-10 cm de diámetro. El fruto está compuesto de una epidermis, un grueso pericarpio, y tejido placentario que rodea a las semillas (Peralta y col., 2008). Además de su importancia económica y nutricional, el fruto del tomate se ha convertido en el modelo para el estudio del desarrollo de frutos carnosos (Quinet y col., 2019).

La maduración del fruto del tomate es un proceso altamente coordinado que coincide con la maduración de la semilla. El ovario comienza a convertirse en fruto una vez que los óvulos en el ovario han sido fertilizados. Durante la primera etapa del desarrollo del fruto, la división y el agrandamiento celular dan como resultado un crecimiento lento (Fig. 1). Después de 2 a 3 semanas de crecimiento lento, comienza un crecimiento rápido, durante el cual las células se continúan agrandando. El crecimiento rápido continúa durante 3 a 5 semanas y culmina en el

estadio verde maduro. En este punto, el tomate ha acumulado la mayor parte de su peso final (Ho y Hewitt, 1986).

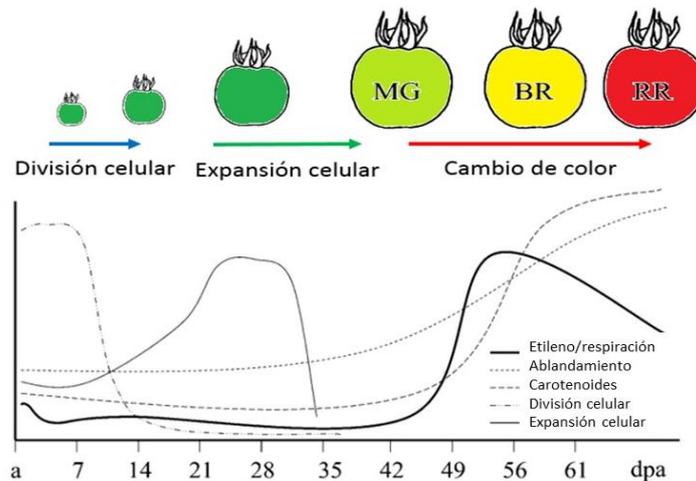


Figura 1. Desarrollo y maduración del fruto de tomate.

Cambios relativos en la división celular, la expansión celular, la respiración, la síntesis de etileno, el ablandamiento de los frutos y la acumulación de carotenoides. El tiempo desde la antesis (a) hasta los estadios verde maduro (VM; fruto totalmente maduro expandido con la semilla madura), virado (BR, primera acumulación visible de carotenoides) y rojo maduro (RR). Dpa, días después de la antesis. (Traducido de: Giovannoni, 2004).

El cambio de color del fruto

La formación y maduración del fruto de tomate involucran un aumento de tamaño, pero también una serie de cambios cualitativos como el cambio de color verde a rojo por degradación de clorofila y aumento del contenido de licopeno durante la transformación de cloroplasto a cromoplasto. La conversión de cloroplasto a cromoplasto es una parte importante del proceso de maduración y normalmente está asociada con el desmantelamiento de la maquinaria fotosintética y la acumulación de carotenoides en los cromoplastos y de azúcares, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos volátiles en las células del fruto (Gillaspy y col., 1993; Klee y Giovannoni, 2011; Camara y col., 1995; Bian y col., 2011).

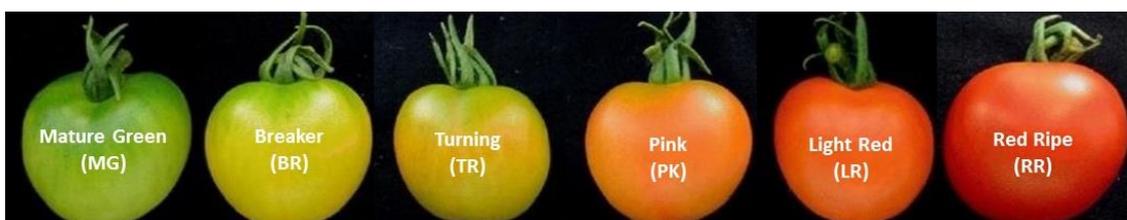


Figura 2. Cambio de color durante la maduración de frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* cv Micro Tom).

Estadios de maduración de acuerdo con los grados estándar del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de tomates frescos para el mercado. Fuente propia.

INTRODUCCIÓN GENERAL

En las primeras etapas de la maduración del fruto del tomate, los frutos son verdes y los plástidos contienen niveles bajos de carotenoides que son esencialmente los mismos que en las hojas verdes, es decir, principalmente β -caroteno, luteína y violaxantina. Durante la transición al estadio “virado” aumenta la transcripción de enzimas de síntesis de licopeno como la fitoeno sintasa y la fitoeno desaturasa (Ronen y col., 1999), que junto con la disminución en los ARNm de enzimas involucradas en la ciclación del licopeno como licopeno β -ciclase y ϵ -ciclase contribuyen a la acumulación de licopeno hasta frutos rojos (Ronen y col., 1999; Barsan y col., 2010). De esta manera, el cambio de color durante la maduración del fruto de tomate se ha categorizado de acuerdo al estadio de transición de cloroplasto a cromoplasto y según el estándar para tomates frescos para el mercado del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en frutos verdes maduros (MG, del inglés mature green), virado (BR, del inglés breaker), pintón (TR, del inglés turning), rosado (PK, del inglés pink), rojo (LR, del inglés light red) y rojo maduro (RR, del inglés red ripe) (Fig. 2).

Las observaciones al microscopio muestran cambios morfológicos en los cloroplastos durante la transición a cromoplasto como la formación de plástidos intermedios que contienen tanto clorofilas como carotenoides, indicando que todos los cromoplastos se derivaban de cloroplastos preexistentes (Egea y col., 2011). Además, se ha observado aumento en el tamaño y número de los plastoglóbulos y un gran número de estrómulos largos en cromoplastos maduros que contrastan con los pocos estrómulos pequeños de los cloroplastos de frutos verdes, por tanto, se puede suponer que el intercambio de metabolitos entre la red de plástidos y entre los plástidos y el citosol aumenta en el cromoplasto en comparación con el cloroplasto (Cheung y col., 1993; Bian y col., 2011).

Control molecular y bioquímico del cambio de color del fruto

Durante la maduración del tomate diferentes eventos ocurren simultáneamente. Estos cambios incluyen, además de la pérdida de clorofila y el desarrollo de caroteno y licopeno; un aumento en la producción de etileno, la síntesis de enzimas que degradan las paredes celulares, el desprendimiento de CO_2 , la descomposición del almidón, el aumento del contenido de glucosa y fructosa, el aumento de la concentración de ácido cítrico y glutámico y la disminución del contenido de ácido málico, por nombrar algunos. Por esto, se establece que diferentes mecanismos de regulación controlan los diversos procesos (Hobson y Davies, 1971).

Al ser el tomate un fruto climatérico, necesita del etileno para la maduración. Esta dependencia del etileno ha establecido la maduración del fruto del tomate como un sistema modelo para el

INTRODUCCIÓN GENERAL

estudio de la regulación de su síntesis y percepción (Fig. 3). Además, varios mutantes de maduración importantes, incluidos *rin* y *nor*, han proporcionado nuevos conocimientos sobre el control de los procesos de maduración (Adams-Phillips y col., 2004; Klee y Giovannoni, 2011).

El fruto de tomate madura a rojo una vez que se inicia la producción de etileno después del estadio verde. Si no se produce etileno o este no es reconocido, debido a tratamientos con inhibidores de la síntesis y percepción de etileno o la manipulación de estos procesos mediante enfoques transgénicos o mutantes, el fruto no madura (Barry y Giovannoni 2007). A pesar del requerimiento absoluto de etileno, algunos procesos de maduración ocurren independientemente de la regulación directa de este. Se han descubierto algunos factores de transcripción que están involucrados en la regulación del etileno y funcionan aguas arriba del etileno (Hiwasa-Tanase, 2016).

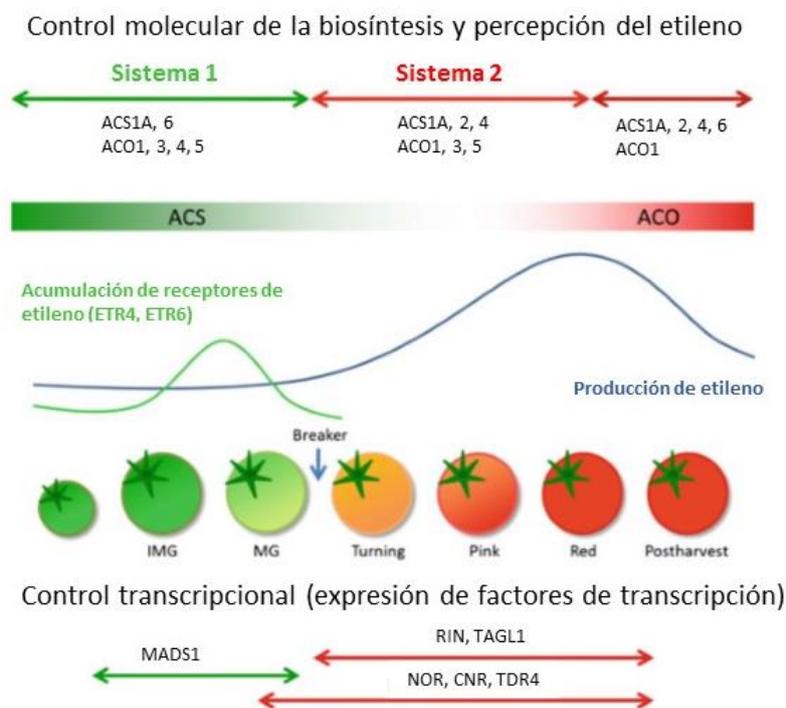


Figura 3. Representación esquemática del proceso de maduración en el fruto del tomate mediada por etileno.

El nivel basal de producción de etileno en el sistema 1 está mediado por la expresión de *ACS1A* y *ACS6* y *ACO1*, *ACO3*, *ACO4* y *ACO5*. La producción de etileno climatérico después del estadio BR en el sistema 2 está mediada por la expresión de *ACS1A*, *ACS2* y *ACS4* y *ACO1*, *ACO3* y *ACO5*. *ACS* es el paso que limita la velocidad de la biosíntesis de etileno del sistema 1 y del sistema 2, mientras que *ACO* es el paso que limita la velocidad de la biosíntesis de etileno post-climatérico. La acumulación de proteínas de *ETR4* y *ETR6* aumenta durante el desarrollo del fruto y luego disminuye antes del estadio BR, que se acompaña de una mayor sensibilidad al etileno. La expresión genética de los factores de transcripción relacionados con la maduración cambia cerca de la fase de transición de la maduración. El ARNm *MADS1* se acumula en la fruta verde inmadura (IMG) y MG y luego disminuye en el estadio BR, mientras que las acumulaciones de ARNm de *RIN* y *TAGL1* aumentan después del estadio BR. Las acumulaciones de ARNm de *NOR*, *CNR* y *TDR4* comienzan a aumentar antes del estadio BR (Traducido de: Hiwasa-Tanase, 2016).

Importancia económica del fruto

El cultivo de tomate es de los más populares en el mundo; su fruto es considerado integrante básico de la dieta humana por lo cual su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. Sin embargo, es un cultivo exigente en disponibilidad de recursos (nutrientes minerales, agua y luz), y asociado a una amplia gama de plagas y enfermedades que conlleva al uso de tareas especializadas. A nivel mundial, la producción de tomate en fresco está en aumento, pasando de 119.479.993 toneladas a 163.963.770 toneladas en un periodo de 10 años, mientras que el tomate industrial pasó de 3.720.000 toneladas a 5.538.000 toneladas. Diez países concentran el 90% de la producción mundial; la posición líder la ocupa Estados Unidos (sobre todo en California), seguido por China, Italia, y Turquía. El resto se concentra en el hemisferio sur (Chile, Brasil, Argentina, y Australia), donde Argentina ocupa el puesto 13 del ranking y participa en promedio con el 1% del total mundial (FAOSTAT: <http://faostat.fao.org/site/>).

El tomate es la hortaliza que mayor superficie ocupa en la producción bajo invernáculo en Argentina. Su destino principal es para consumo fresco en el mercado interno, aunque el porcentaje destinado a la industria representa un 35 a 40% de la producción total. Dada la facilidad de producir tomate en diferentes épocas del año según la zona de producción, y sumado a la difusión de su cultivo en invernáculo, la oferta se adecua bastante bien a la demanda. No obstante, en determinadas situaciones hay faltante de producto, especialmente hacia fines del invierno y comienzo de la primavera, lo que determina que algunos años se importen de países vecinos (Brasil, Uruguay, Paraguay y Chile) (PACIT, 2015).

La producción de tomate se encuentra distribuida a lo largo de todo el país, excepto en el sur de la Patagonia. Las provincias de Mendoza, San Juan, Santiago del Estero, Catamarca y Río Negro se dedican principalmente a la producción de tomate para uso industrial (tomate perita) y el tomate redondo para consumo fresco se produce en Buenos Aires, Salta, Jujuy, Tucumán, Corrientes, Santa Fe y otras provincias (PACIT, 2015).

Calidad del fruto

La calidad del fruto en el tomate es una característica apreciada por los productores a la hora de elegir un cultivar. Hoy en día los mercados están interesados en diferenciar los productos por atributos relacionados con caracteres organolépticos (Causse y col., 2002; Powell y col., 2012). Sin embargo, una parte importante de la mejora genética del tomate está dirigida hacia caracteres de calidad de fruto. El mayor interés tanto en fruto fresco como para industrias

INTRODUCCIÓN GENERAL

incluye características relacionadas con tamaño y forma del fruto, cantidad de azúcares, acidez, color, textura, contenido nutricional y sabor, entre otros (Barrantes, 2014).

Es controversial si la actividad fotosintética que realiza el fruto en sus primeras etapas de formación contribuye significativamente a la acumulación de biomasa y calidad del fruto (Cocaliadis y col, 2014). Sin embargo, se ha observado que frutos de tomate que acumulan mayor cantidad de cloroplastos al estado inmaduro alcanzan mayor cantidad de azúcares y licopeno al estado maduro, mejorando la calidad del fruto (Powell y col., 2012). Ello pone en evidencia, la potencial contribución que podría realizar la actividad fotosintética en los frutos. Además, es posible que las funciones de los cloroplastos sean importantes determinando ciertas características cualitativas como, por ejemplo, la capacidad de sintetizar y acumular antioxidantes o vitaminas como el ácido ascórbico.

Las especies reactivas del oxígeno

El oxígeno es el elemento más abundante sobre la corteza terrestre, principalmente en su forma de molécula gaseosa, constituyendo el 21 % en volumen del aire seco. Por ello su elevada concentración es casi inevitable en cualquier sistema de reacción (Foote y Clennan, 1995). Su reactividad y la generación de estados excitados en función de la radiación hacen al oxígeno molecular una especie muy importante desde el punto de vista fotoquímico.

De manera habitual, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O_2), es decir, en lo que se conoce como estado triplete, así el oxígeno es poco reactivo. Sin embargo, por reacciones puramente químicas, enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes se pueden producir una serie de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species). Las ROS son moléculas o radicales libres altamente reactivos que participan en múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, llegando a producir daño celular (Fridowich, 1978). Desde el punto de vista químico, los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo que les da una configuración especial y gran inestabilidad, son muy reactivos y tienen una vida media corta, por lo que actúan cerca al sitio en que se forman y son difíciles de cuantificar (Cheesman y Slater, 1998). Las ROS fueron inicialmente reconocidas como subproductos tóxicos del metabolismo aeróbico, removidos por medio de antioxidantes y enzimas antioxidantes. En los últimos años, se ha hecho evidente que las ROS desempeñan un papel importante en la señalización de las plantas participando en procesos como el

crecimiento, el desarrollo, la respuesta a estímulos ambientales bióticos y abióticos, y muerte celular programada (Bailey-Serres y Mittler 2006).

Fuentes celulares de producción de ROS

Las ROS en las plantas existen en estados iónicos y / o moleculares (Tabla 1). Entre los estados iónicos se encuentra el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), mientras que los estados moleculares incluyen al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el oxígeno singlete (1O_2) (Blokchina, 2003; Apel y Hirt, 2004; Mittler y col., 2004). Cada tipo de ROS tiene diferente capacidad oxidativa y afecta a diferentes procesos fisiológicos y reacciones bioquímicas reguladas por diferentes genes en las plantas (Huang y col., 2019).

Radicales libres	No radicales
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Hidroperoxilo, HO_2^{\cdot}	Oxígeno singlete, 1O_2 o $^1\Delta_g$
Hidroxilo, $\cdot OH$	Ozono, O_3
Peroxilo, ROO^{\cdot}	Ácido hipocloroso, $HOCl$
Alcoxilo, RO^{\cdot}	Peroxinitrito, $ONOO^-$

Tabla 1. Principales especies reactivas del oxígeno (ROS).
Traducido de: Halliwell y Gutteridge, 2007.

El oxígeno singlete (1O_2), es un estado energéticamente excitado del oxígeno molecular, generado principalmente en el Fotosistema II del cloroplasto donde participa en numerosas reacciones de oxidación como especie reactiva y con gran impacto en la fotosíntesis. El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), es el precursor de varios ROS debido a su inestabilidad y fuerte capacidad de oxidación / reducción. A pesar de estar involucrado en diferentes procesos metabólicos, el exceso de anión superóxido también causa aumento en los niveles de ROS y eventualmente conduce a la muerte celular (Zeng y col., 2017; Gilly Tuteja, 2010). El anión superóxido es producido en la cadena transportadora de electrones de los cloroplastos y las mitocondrias y por la actividad de NADPH oxidasa (NOX) de membranas, donde una vez producidos reaccionan con iones de hidrógeno para formar H_2O_2 , por la actividad de superóxido dismutasa (SOD). Entre las ROS, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se considera la molécula redox más importante dadas sus propiedades físicas y químicas específicas; incluida su estabilidad dentro de las células (vida

media de 10^{-3} s), oxidación rápida y reversible de las proteínas diana (Mittler, 2017; Mhamdi y Van Breusegem, 2018), y la posibilidad de ser transportado por acuaporinas localizadas en la membrana celular (Bienert y col., 2007; Miller y col., 2010).

Mecanismos endógenos de protección contra ROS

En condiciones normales, el exceso de ROS puede ser eliminado por varios mecanismos de defensa antioxidantes. Alteraciones repentinas del equilibrio redox, causadas por estrés biótico o abiótico, pueden causar aumentos en los niveles de ROS intracelulares y dañar significativamente las estructuras celulares (Apel y Hirt, 2004; Foyer y Noctor, 2005; Bailey-Serres y Mittler 2006). En general, las plantas hacen frente a la generación excesiva de ROS cuando el aumento en los niveles de ROS es detectado. Los mecanismos de eliminación de ROS se pueden clasificar en dos tipos: antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, que funcionan de forma conjunta para neutralizar los radicales libres. Los sistemas enzimáticos incluyen principalmente SOD, catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión peroxidasa (GPX), entre otras enzimas, mientras que los sistemas no enzimáticos están principalmente mediados por antioxidantes de baja masa molecular como glutatión, ácido ascórbico, α -tocoferol, carotenoides, compuestos fenólicos, melatonina y prolina (Foyer y Shigeoka, 2011; Mittler, 2017; Gill y Tuteja, 2010; Miller y col., 2010; Gill y col., 2011; Noctor y Foyer, 1998, Noctor y col., 2017). Se ha demostrado que cuando los niveles de ROS son bajos cumplen un papel como segundos mensajeros, participando en el mantenimiento de las células madre, división y diferenciación celular, organogénesis y respuestas a los estreses bióticos y abióticos (Fujita y col., 2006; Zeng y col., 2017).

El papel de las ROS en la señalización en plantas

Diferentes estudios sobre la producción y eliminación de ROS en plantas resumen el progreso en la comprensión del papel de las ROS integrando señales genéticas, epigenéticas, hormonales y externas para promover el desarrollo y la adaptación ambiental (Huang y col., 2019). En particular, se ha demostrado que el H_2O_2 participa en la diferenciación celular, la senescencia, la muerte celular programada, la formación de la pared celular en las plantas, respuestas a estrés y en la maduración de frutos (Moller y col, 2007; Karkonen y Kuchitsu, 2015; Schippers y col., 2016; Waszczak y col., 2016; Ribeiro y col., 2016; Zeng y col., 2017).

El Ácido ascórbico

El ácido ascórbico (AA) o vitamina C, es un ácido orgánico y el principal antioxidante presente en las células vegetales. Su principal función es la eliminación de ROS mediante detoxificación tanto enzimática como no enzimática. Además, actúa como una molécula señal en numerosos procesos, incluyendo la división y expansión celular, el metabolismo de la pared celular, la formación de meristemas apicales, el crecimiento de la raíz, la fotosíntesis, respiración, la regulación de la floración, la senescencia, el desarrollo de los frutos y en respuestas de defensa frente a situaciones de estrés ambiental (Foyer y Noctor, 2011; Asada, 1999; Pastori y col., 2003; De Simone y col., 2018; Pavet y col., 2005; Bartoli y col., 2006; 2009; Gilbert y col., 2009; Caviglia y col., 2018; Alegre y col., 2020).

Biosíntesis del AA

El conocimiento de la biosíntesis del AA es de gran interés por dos motivos fundamentales: es un componente clave del sistema antioxidante de las plantas y éstas son la principal fuente de vitamina C en la dieta humana (Smirnov y col., 2001).

La síntesis del AA en plantas se realiza a partir de azúcares simples derivados de la fotosíntesis. En el primer paso, de aquéllos que son considerados exclusivamente dedicados a su síntesis, la enzima GDP-L-galactosa fosforilasa (GGP) en su dos isoformas (GGP1 Y GGP2), cataliza la reacción por la cual se forma L-galactosa-1-P a partir de GDP-L-galactosa (Dowdle y col., 2007). En la siguiente reacción, catalizada por la galactosa-1-fosfatasa se forma L-galactosa y posteriormente por la enzima L-galactosa deshidrogenasa, se genera el precursor del AA; la L-galactono-1,4-lactona (L-GalL). La última etapa que es catalizada por la enzima L-GalL deshidrogenasa (L-GalLDH), tiene lugar en las mitocondrias y consiste en la oxidación de la L-GalL que cede electrones para la reducción del citocromo c (Bartoli y col., 2000). En plantas superiores, la biosíntesis del AA tiene lugar mediante la ruta D-manosa/L-galactosa o ruta de Smirnov-Wheeler (Wheeler y col., 1998; Smirnov y Wheeler 2000).

Funciones del AA

La mayoría de las funciones del AA están relacionadas con su papel como cofactor de numerosos procesos enzimáticos en plantas. Entre las enzimas que usan al AA como cofactor se encuentra la ascorbato peroxidasa (APX), la cual es probablemente la enzima más conocida debido a su capacidad para usar AA específicamente en la eliminación del H₂O₂. Por otro lado, el AA puede reaccionar con las ROS como el H₂O₂, el O₂⁻ y el ·OH (Gest y col., 2013).

INTRODUCCIÓN GENERAL

Además, el AA es cofactor de muchas dioxigenasas dependientes de oxiácidos, que catalizan la incorporación de oxígeno a sustratos orgánicos. Este tipo de dioxigenasas comparten un mecanismo catalítico común que requiere de forma específica AA, Fe^{2+} y 2-oxoglutarato. Entre las dioxigenasas involucradas en la biosíntesis de hormonas, donde el AA actúa como cofactor, están la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasas de la biosíntesis del ácido abscísico (ABA) y la 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACO), la enzima que cataliza el último paso de la biosíntesis del etileno (Prescot y John, 1996). El AA además actúa como cofactor de la actividad de la violaxantina de-epoxidasa, en el ciclo de las xantófilas. Este ciclo permite la disipación de energía luminosa como calor en condiciones de alta irradiancia con el fin de proteger la maquinaria fotosintética en condiciones de estrés lumínico (el denominado “quenching no fotoquímico”) (Prescot y John, 1996; Muller-Moule y col., 2002).

El AA como antioxidante ante estrés oxidativo por generación de ROS

El AA participa en la eliminación del H_2O_2 principalmente por la actividad de la APX presente en los tilacoides y el estroma (Gómez y col., 2004), en colaboración con los componentes del ciclo denominado ascorbato-glutatión (AA-GSH), y por la actividad de las diferentes peroxiredoxinas (Prx), tioredoxinas (Trx) y sulfurodoxinas (Srx) (Dietz, 2016). Todos estos sistemas colaboran en la reducción del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O . El ciclo AA-GSH se ha descrito en el cloroplasto, mitocondrias, peroxisomas, apoplasto y citosol (Jiménez y col., 1997; del Río y López-Huertas 2016), e involucra al AA, el glutatión (GSH) y las enzimas APX, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR). En este ciclo se forma el monodehidroascorbato (MDHA), y a partir de esto, el dehidroascorbato (DHA) resultante de la dismutación espontánea se usa para reciclar el AA por la acción de la MDHAR dependiente de NADH y por la DHAR, que usa GSH reducido como donantes de electrones. El DHA puede sufrir hidrólisis irreversible, por lo que DHAR puede tener un importante control en el mantenimiento de la reserva de AA reducido a nivel celular (Gallie, 2013; Noctor y Foyer, 1998; Jimenez y col., 1998; Smirnoff y Wheeler, 2000).

Alternativamente, la regeneración de AA también puede tener lugar debido a otros compuestos redox como la glutarredoxina (Grx) y el sistema Trx (Meyer y col., 2012; Potters y col., 2002). El glutatión oxidado (GSSG) se regenera por la tioredoxina reductasa (NTR) dependiente de NADPH (Barranco-Medina y col., 2007; Martí y col., 2009; Cejudo, 2014). En consecuencia, el estado redox celular dependerá en parte de los grupos tiol y disulfuro de los antioxidantes, entre

otros, el antioxidante GSH y las proteínas Trx, Prx, Srx y Grx (Fig. 4), (Foyer y Noctor 2013; Yoshida y col., 2018).

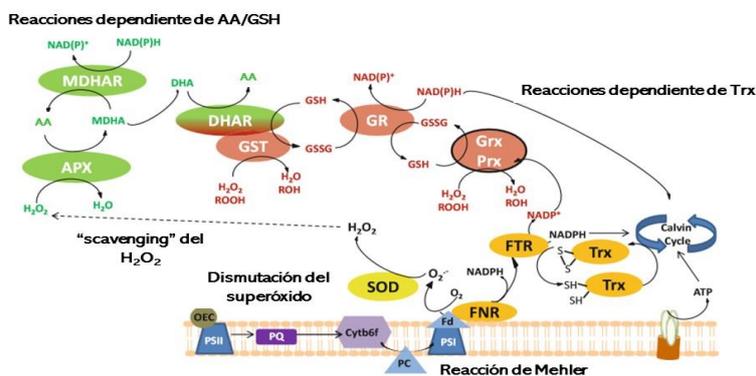


Figura 4. El ciclo agua-agua y el sistema antioxidante implicado en la captación de ROS en los cloroplastos.

El flujo de electrones se produce en el PSI (reacción de Mehler) para generar $O_2^{\cdot-}$, que dismuta a H_2O_2 . El ciclo AA-GSH en coordinación con el sistema Trx / Prx / Grx se encarga del control de los niveles de H_2O_2 . APX (ascorbato peroxidasa), citocromo b6f (Cytb6f), DHAR (deshidroascorbato reductasa), Fd (ferredoxina), FNR (Fd reductasa), GST (glutathión S-transferasa), GR (glutathión reductasa), Grx (glutaredoxina), MDHAR (monodehidroascorbato reductasa); PSI (fotosistema I), PSII (fotosistema II), Prx (peroxidoredoxina) Trx (tiorredoxina), TR (tiorredoxina reductasa), PC (plastocianina), SOD (superóxido dismutasa) (adaptado de Foyer y Noctor, 2011. En: Jiménez y col., 2019)

Deficiencia de AA en plantas de tomate

El análisis de mutantes para los genes de biosíntesis del AA es una herramienta valiosa para descifrar el papel fisiológico del AA en las plantas. Mutantes *vct1* de Arabidopsis, deficientes en AA debido a defectos en la actividad de GDP-d-manosa pirofosforilasa (Conklin y col., 2000), además de mutantes *vtc4* para la galactosa fosfatasa (Conklin y col., 2006) y mutantes *vtc2* / *vtc5* para la GDP-l-galactosa fosforilasa (GGP) (Dowdle y col., 2007), han sido utilizados para descifrar la vía Smirnoff-Wheeler de biosíntesis de AA.

Entre las diversas enzimas implicadas en la biosíntesis de AA, la GGP juega un papel clave en la regulación de la biosíntesis de AA en plantas (Bulley y col., 2012; Linster y Clarke, 2008), y junto con la GDP-d-manosa epimerasa (GME), son cruciales para la síntesis de las formas activas de D-manosa y L-galactosa; precursoras tanto del AA, como de componentes clave de la pared celular; mananos y ramnogalacturonanos (Gilbert y col., 2009; Keller y col., 1999; Voxeur y col., 2011). Además, estudios recientes en plantas de tomates mutantes *Slgpp1* para la isoenzima GGP1 (Fig. 5), muestran menor contenido de AA en raíces, hojas, flores y frutos (Baldet y col., 2013; Alegre y col., 2020), y mayor sensibilidad al estrés por altas irradiancias en hojas (Baldet y col., 2013), menor rendimiento de los frutos y mayor firmeza en frutos maduros (Alegre y col., 2020). Sin embargo, la vía no está totalmente interrumpida en estos mutantes pues hay otra isoenzima, la GGP2, que realiza una contribución menor a la síntesis de AA (Baldet y col., 2013). Estudios con mutantes *Slgpp1* podrían establecer la conexión de las vías de biosíntesis del ascorbato, la pared

celular, el desarrollo de la calidad sensorial y nutricional del fruto, el cambio de color y la firmeza del fruto del tomate.



Figura 5. Plantas de tomate micro-Tom silvestres (a) y mutantes *Slppq1* (b y c).

Las ROS y el AA durante la maduración del fruto de tomate

El AA es uno de los principales componentes nutricionales presente en los frutos. Es un compuesto que posee vitales funciones en plantas y animales (Locato y col., 2013). Su contenido aumenta durante la maduración de los frutos de tomate constituyendo éstos una importante fuente de AA en la dieta de los seres humanos (Stevens y col., 2007). Su síntesis y sus funciones están estrechamente relacionadas con la actividad fotosintética y respiratoria de las plantas (Yabuta y col., 2007; Bartoli y col., 2000).

En términos generales, las ROS, el AA y las enzimas antioxidantes se regulan positivamente durante el desarrollo de los cromoplastos (Fig. 6), y los lípidos, más que las proteínas, parecen ser un objetivo para la oxidación de estas ROS (Martí y col., 2009; 2011). En los cromoplastos, se observó una regulación positiva de la actividad de la SOD y de los componentes del ciclo ascorbato-glutatión (Jiménez y col., 2002; Martí y col., 2009; Palma y col., 2015; Huan y col., 2016; Steelheart y col., 2019b). Por otro lado, no se ha estudiado aún si la deficiencia de AA produce específicamente alteraciones en la maduración de frutos, especialmente teniendo en consideración la estrecha interacción del metabolismo del AA con la respiración y la fotosíntesis observada en hojas (Bartoli y col., 2006; 2009).

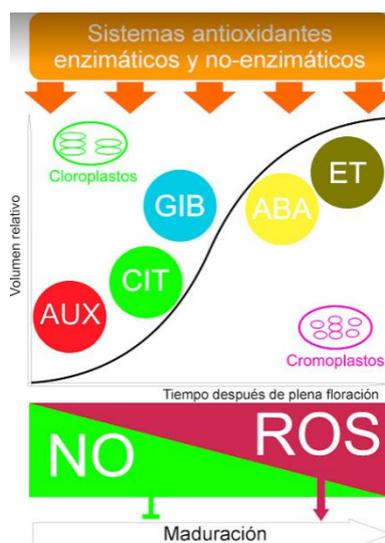


Figura 6. Influencia hormonal durante el crecimiento / maduración del fruto y la interacción con NO, H₂O₂ y antioxidantes.

La línea negra representa el patrón sigmoide simple del crecimiento de la fruta. Durante la primera etapa del crecimiento del fruto, las auxinas (AUX), las giberelinas (GIB) y las citoquininas (CYT) controlan la división y expansión celular, mientras que el ácido abscísico (ABA) y el etileno (ET) juegan un papel central en la maduración y el cambio de color de los frutos climatéricos y no climatéricos. El contenido de NO es mayor en las primeras etapas y disminuye con el proceso de maduración, mientras que la producción de ROS aumenta en la etapa de maduración. Los sistemas antioxidantes enzimáticos (catalasa, ascorbato peroxidasa) y no enzimáticos (AA, glutatión y licopeno), actúan como contrapartida en la homeostasis redox celular. El equilibrio oxidante / antioxidante desencadena la transición de cloroplastos a cromoplastos y la acumulación de pigmentos que producen el cambio de color del fruto. El H₂O₂ actúa como un promotor de la maduración de los frutos, mientras que el NO actúa posiblemente como una molécula “anti-senescencia”. (Traducido de Steelheart y col., 2019b)

Definición del problema

El tomate es uno de los frutos más consumidos a nivel mundial, habiéndose seleccionado cultivares en función de la productividad y las características agronómicas de la planta antes que la calidad de fruto. Debido a que las características de calidad del fruto como sabor, aroma, color, textura y alto contenido de licopeno (superior a 10 mg 100 g⁻¹), junto con el alto valor nutritivo por su contenido de vitamina C (Valcárcel, 2009), que comenzaron a ser valoradas por los consumidores, la tendencia actual en la investigación es el mejoramiento genético para desarrollar nuevos cultivares incorporando características deseables de calidad. Sin embargo, a pesar del alto contenido de AA y de ser un componente nutricional importante en el tomate, no se han realizado estudios enfocados en su función durante el desarrollo y cambio de color del fruto. El análisis de mutantes y plantas transgénicas deficientes de AA de diversas especies han permitido determinar el papel de AA durante el desarrollo de la planta, observándose que éstas presentan un aumento de la sensibilidad al estrés ambiental y aumento de la resistencia basal a los patógenos (Barth, De Tullio, y Conklin, 2006b; Caviglia y col., 2018; Pavet y col., 2005; Plumb y col., 2018; Senn y col., 2016). Baldet y col. (2013), a través del uso de mutantes simples con deficiencia de GDP-L galactosa fosforilasa en dos genes con función complementaria, *SIGGP1* y *SIGGP2*, observaron que poseen una baja concentración de ascórbico en sus hojas y

fotoinhibición y blanqueamiento de la clorofila cuando son sometidos a condiciones de alta irradiancia. En el presente trabajo estos mutantes con deficiencia de GDP-L galactosa fosforilasa fueron usados para estudiar el papel de AA en el desarrollo del fruto durante la transición de cloroplastos a cromoplastos. Por otro lado, Jiménez y col. (2011), observaron un pico en el contenido de H₂O₂ en los primeros estadios de la transición de cloroplasto a cromoplasto en frutos de tomate que se relacionó a un efecto del estrés originado por el desmantelamiento del aparato fotosintético. Debido a que el AA se reconoce como uno de los principales antioxidantes a través del clivaje del H₂O₂ por el ciclo agua-agua (Foyer y Noctor, 2011), y siendo el tomate un fruto climatérico, en el presente trabajo se analizó la relación del etileno con los cambios del perfil oxidativo y la producción de H₂O₂ que se genera durante la transición de cloroplastos a cromoplastos en frutos de plantas mutantes deficientes en AA durante el desarrollo del fruto.

Hipótesis y objetivos

El **objetivo general** de este trabajo fue establecer la contribución del AA al proceso de maduración y la calidad nutricional de los frutos de tomate. La utilización de líneas de plantas de tomate con deficiencia en el contenido de AA por una mutación en una enzima específica de su síntesis permitirá determinar la participación de este metabolito en la actividad de cloroplastos y en la formación de cromoplastos durante el desarrollo de frutos de tomate.

La **hipótesis** que se va a contrastar es que el AA desempeña un papel central en el control del estrés oxidativo desencadenado durante la transición de cloroplastos a cromoplastos durante la maduración de frutos de tomate.

Objetivo específico 1. Establecer el efecto del bajo contenido de AA presente en plantas de tomate mutantes deficientes en GDP-L-galactosa fosforilasa en la calidad del fruto durante la maduración.

Objetivo específico 2. Determinar el efecto de tratamientos con AA y H₂O₂ en la velocidad de maduración de frutos de plantas de tomate mutantes deficientes en GDP-L-galactosa fosforilasa con bajo contenido de AA.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Objetivo específico 3. Establecer el efecto del bajo contenido de AA en la maduración modulada por etileno de frutos de plantas de tomate mutantes deficientes en GDP-L-galactosa fosforilasa.

Objetivo específico 4. Determinar el efecto del estrés inducido por altas irradiancias en la maduración de frutos de plantas de tomate mutantes deficientes en GDP-L-galactosa fosforilasa con bajo contenido de AA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom), silvestres y dos líneas mutantes (nombradas GGP-5261 y GGP-49C12), deficientes en GDP-L-galactosa fosforilasa (*Slgpp1*). Las líneas GGP-5261 y GGP-49C12 se seleccionaron de la población de tomate NBRP (Tsukuba-Japón) y la colección TILLING-tomate (Burdeos-Francia), respectivamente (Baldet y col., 2013). Los experimentos se llevaron a cabo en los invernaderos del Instituto de Fisiología Vegetal, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Las plantas se cultivaron en macetas de 3 L con tierra común y con el agregado de fertilizantes bajo irradiación de invernadero normal (densidad de flujo de fotones fotosintéticos de aproximadamente $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ al mediodía), y temperaturas de 25 ± 2 y 20 ± 3 °C, día y noche, respectivamente.

Las plantas de Micro-tom presentan crecimiento determinado con aproximadamente 6 racimos de 6 frutos cada uno y debido a que el proceso de cambio de color de los frutos se produce de manera homogénea, se seleccionaron cuatro estadios de maduración referentes al color según los estándares establecidos para tomate fresco comercial del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Tu y col., 2000), para el análisis de los parámetros fisiológicos, bioquímicos y moleculares:

Verde maduro (MG): fruto que ya alcanzó su tamaño final y firme, con semillas desarrolladas, mesocarpio gelatinoso y epicarpio de color verde. Este estadio se diferencia del verde inmaduro por el cambio en el brillo del epicarpio y por presentar el tamaño final del fruto.

Amarillo (BR): fruto con las primeras señales de cambio de color, el mesocarpio se conserva verde y conserva la firmeza del estadio verde, con el epicarpio de color amarillo.

Pintón (OR): fruto de transición entre el estadio amarillo y rojo, el mesocarpio cambia a color rosa y comienza a perder la firmeza, con al menos 70% del epicarpio de color naranja.

Rojo maduro (RR): frutos completamente maduro, con la firmeza características de los frutos maduros, mesocarpio rosa o rojo y epicarpio completamente rojo.

Tratamientos

El efecto de los tratamientos en la maduración medida como cambio de color se determinó en frutos de estadios MG, BR, OR y RR. Fueron usadas tres plantas por tratamiento en cinco

MATERIALES Y MÉTODOS

experimentos independientes. Los tratamientos fueron aplicados una vez que las plantas presentaran frutos en estadio MG, a la hora de la tarde, tres veces a la semana durante 20 días o hasta que los frutos llegaran a estadio rojo (los tratamientos de 1-MCP al retrasar la cosecha prolongaba el tiempo de los tratamientos). La cosecha de los frutos para los análisis bioquímicos y moleculares se realizaba una semana después de iniciado los tratamientos en horas de la mañana y se iban seleccionando favoreciendo la cosecha de tomates en estadio BR, debido a que este estadio dura sólo un día. Las cosechas se realizaban en los días que no se realizaba tratamiento y procurando cosechar frutos ubicados en el centro de los racimos por presentar el crecimiento más uniforme. Los frutos no usados en los análisis se dejaban crecer en la planta.

Suplementación de AA y H₂O₂

Frutos en estadio MG en la plata fueron rociados tres veces por semana por 20 días con 5 ml por planta de AA 20 mM y H₂O₂ 10 mM, pH=5,7. Los controles se rociaron con agua destilada y se utilizó 0,01% v/v Tween 20 como surfactante en todos los tratamientos.

Suplementación con ACC y 1-MCP

Plantas con frutos en estadio MG fueron rociadas tres veces por semana con 5 ml de ACC 0,5 mM usándose como control agua destilada y 0,01% v/v Tween 20 como surfactante. Para los tratamientos de 1-MCP, plantas con frutos en estadio MG fueron puestas en cámara hermética por 12 horas para tratamiento gaseoso con 1-MCP a una concentración de 8 ppm y sin 1-MCP como tratamiento control, tres veces a la semana por 20 d o hasta que los tomates alcanzaron el estadio RR.

Suplementación de alta irradiancia

Plantas cultivadas en el invernáculo (GI), con frutos en estadio MG se trasladaron al exterior del invernadero (HI) entre las 9 y las 15 h UT (Tiempo Universal) en un día soleado y se expusieron a la luz solar durante 20 d (temporada de verano de 2018 y 2019). La intensidad de la luz superó los 2000 μmol de fotones. m^{-2} . s^{-1} PPFD (entre 2000 y 2500 μmol de fotones. m^{-2} . s^{-1} PPFD en promedio), durante el transcurso del tiempo del experimento. La radiación fotosintéticamente activa (PAR), se determinó en días claros durante 3 días despejados, en 4 momentos: 9, 12, 14 y 17 h UT, en cada ocasión. Las temperaturas del aire libre cerca de las macetas se tomaron también para 4 momentos: 9, 12, 14 y 17 h UT, con termómetro infrarrojo; se evaluaron las

MATERIALES Y MÉTODOS

temperaturas mínimas y máximas para generar un promedio. Las mediciones se realizaron durante 3 días y registradas al mismo tiempo y sobre el mismo lugar en las que se midió el PAR.

Sólidos solubles, pH y acidez titulable

Muestras compuestas de 10 g de diferentes frutos (entre 4-5 frutos), fueron procesados con mortero para generar un macerado que fue usado para determinar el contenido total de sólidos solubles (TSS), pH y acidez titulable (ATT). Se colocaron unas gotas de jugo del procesado de tomate en un refractómetro (Milwaukee MA871, Rocky Mount, EE. UU.), para determinar el contenido de sólidos solubles el cual se expresó en % p / p. El procesado diluido en 100 ml de agua destilada fue usado para determinar el pH con un medidor de pH (Hanna Edge®), y la ATT por titulación con una solución 0,1 N de NaOH L⁻¹ hasta alcanzar un pH de 8,2 (AOAC, 1980). La TTA se expresó en g de ácido cítrico por kg de peso fresco de fruto.

Tasa respiratoria

La tasa respiratoria se determinó con un sensor infrarrojo de CO₂ (Lutron Electronic Enterprise Co. L.T.D., modelo GC-2028) a 23 °C. Se colocaron cuatro frutos intactos recién cosechados (típicamente 15 g en total) en una cámara de vidrio hermética de 1,74 L y se registró la concentración de CO₂ en la atmósfera cada minuto durante al menos 20 minutos. Los resultados se expresaron en mmol de CO₂ kg⁻¹PF h⁻¹.

Textura

Para determinar la firmeza del fruto se utilizó un analizador de textura (TA. XT. PLUS, Micro Systems TM Goldalming, Surrey, Reino Unido) con una sonda plana de 2,5 mm de diámetro según Alegre y col. (2020.) Las pruebas de deformación se establecieron con los siguientes parámetros: distancia 0,5 cm, prueba de velocidad 0,25 cm s⁻¹ y 0,058 N de fuerza de disparo. La fuerza máxima de la prueba se registró para analizar la firmeza de la fruta.

Clorofila y carotenoides

Los ensayos de clorofila-a, clorofila-b y contenido de carotenoides fueron realizados según Arnon (1949). Aproximadamente 300 mg de pericarpio de frutos congelados y pulverizados con nitrógeno líquido fueron homogeneizados en 1,5 ml de acetona al 80% y luego centrifugados 15 min 3000 rpm a 4 °C. Se utilizaron los sobrenadantes para el análisis de pigmentos. Las

MATERIALES Y MÉTODOS

absorbancias se determinaron a 645, 652, 663 y 470 nm en un espectrofotómetro AV-160A Shimadzu, Japón. Las siguientes ecuaciones se utilizaron para los cálculos (Litchenthaler y Wellburn, 1983):

$$\text{Chl total} = \frac{A_{652} \cdot 27,8}{\text{mg de tejido}} \times 20$$

$$\text{Chla} = \frac{11,75 \cdot A_{663} - 2,35 \cdot A_{645}}{\text{mg de tejido}} \times 20$$

$$\text{Chlb} = \frac{18,61 \cdot A_{645} - 3,96 \cdot A_{663}}{\text{mg de tejido}} \times 20$$

$$\text{Carotenoides totales} = \frac{1000 \cdot A_{470} - 2,27 \cdot \text{Chla} - 81,4 \cdot \text{Chlb}}{227 \cdot \text{mg de tejido}} \times 20$$

Tiempo de maduración

El efecto de los tratamientos sobre el tiempo de maduración se determinó contando los días desde el estadio MG hasta el estadio RR en cada fruto, analizando el cambio de color de 2 frutos por planta en estadio MG que fueron marcados en las tres plantas de los tres genotipos analizados que se utilizaron por cada tratamiento, en los 5 experimentos independientes. Para cada tratamiento, se tomó el número de días para la maduración cuando el 50% más un fruto alcanzaron el estadio RR.

Evaluación de la respuesta fotosintética

El efecto de la alta irradiancia en la fotosíntesis fue medido en 5 frutos de los cuatro estadios de maduración en cada experimento, durante horas del mediodía a valores de irradiancias naturales que recibieron *in situ*.

Tasas de transporte de electrones (ETR)

Se determinó con un sistema portátil de medición de la fluorescencia modulada de la clorofila (FMS-2, Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, Reino Unido) y se calculó de acuerdo con Genty y col., 1989. La ETR ('Electron Transport Rate') es un parámetro que se obtiene a partir de ϕ PSII (rendimiento cuántico), la densidad de flujo fotónico fotosintético incidente (PPFD), la absorbancia y 0,5 que es la fracción de luz que es absorbida por el PSII (se asume una absorción equivalente de ambos fotosistemas). En este caso se consideró para los frutos una absorbancia de 0,85 ya que este es un valor muy conservado en hojas de diversas especies (Tambussi y Graciano, 2010b).

“Quenching” no fotoquímico (NPQ)

Los parámetros de fluorescencia de la clorofila fueron calculados según Baker (2008), con la siguiente fórmula: $(F_m - F_m')/F_m'$.

Eficiencia del PSII (Fv/Fm)

La fotoinhibición está relacionada con una disminución del rendimiento de la fluorescencia variable (Fv) de la clorofila *a* del PII, lo que se manifiesta en una disminución del coeficiente de fluorescencia variable y fluorescencia máxima (Fv/Fm) (Krause y Weis, 1984; Krause, 1988). Para medir este parámetro se usó el medidor de fluorescencia modulada de la clorofila, utilizando el método del pulso saturante (Tambussi y Graciano, 2010b). Hojas y frutos con pinzas (“clips”) especiales, que permiten oscurecer un sector a medir por 30 minutos a modo de aclimatar las hojas a la oscuridad y relajar los mecanismos de disipación no fotoquímica. Esta medición fue la última del día. El coeficiente Fv/Fm puede tomar valores entre 0 y 0,85 indicando una relación directa con el porcentaje de centros funcionales del PII, es decir, que una disminución de los valores en general pone de manifiesto un daño y una pérdida de función a nivel del aparato fotosintético.

Determinación de especies reactivas del oxígeno

La producción de H₂O₂ en el fruto se determinó sumergiendo el fruto entero (peso fresco de aproximadamente 3 g), en 3 ml de una solución que contiene 10,000 U L⁻¹ de peroxidasa de rábano picante, 10 μmol L⁻¹ Amplex Red (N-acetil-3,7-dihidroxi Fonxazina) y 50 mmol de buffer Tris-HCl pH=7 (kit de ensayo Amplex Red, sondas moleculares), y se analizaron 5 frutos de cada estadio de maduración para cada experimento. La reacción fue lineal durante varias horas. La fluorescencia del amplex red en la solución debido a la presencia del H₂O₂ saliendo del tejido por difusión, se registró 100 minutos después de comenzar la incubación con un lector de microplacas multimodal CLARIOstar® Plus (Ortenberg, Alemania) en modo de fluorescencia a longitudes de onda de excitación de λ=560 nm (Zhou y col., 1997). Los resultados se expresaron en μmol mg⁻¹ PF h⁻¹. Se analizó el H₂O₂ en la solución por difusión desde el fruto entero para analizar el contenido de H₂O₂ en el pericarpio del fruto, relacionado con el cambio de color.

Detección subcelular de ROS

Inmediatamente después de la cosecha, 5 frutos de cada estadio de maduración fueron lavados y sus pericarpios cortados en rodajas finas con un micrótopo de mano para la localización

MATERIALES Y MÉTODOS

subcelular de ROS según Ramos-Artuso y col. (2019). Los segmentos se incubaron en una solución de 50 mM Tris/HCl pH=7,4, que contenía 0,025 mM diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA, Sigma-Aldrich®) durante 30 min en la oscuridad. Luego se enjuagaron con la misma solución sin la sonda fluorescente. Los tejidos se observaron utilizando un microscopio láser espectral confocal (Leica TCS SP5, ex = 488 nm y em = 525 nm). Rodajas de fruto incubados en la solución sin DCFDA se utilizaron como diana para descartar la existencia de auto fluorescencia.

Determinación de las peroxidación lipídica

La concentración de malondialdehído (MDA) como referente a la peroxidación lipídica se midió en 200 mg de pericarpio de una muestra compuesta de 3 frutos congelados y pulverizados con nitrógeno líquido en 1 ml de buffer 50 mM fosfato de potasio pH=7,0 y 100 µl de una solución 0,2 % v/v de etanol al de hidroxitolueno butilado para la medición de MDA. Los homogeneizados se centrifugaron a 16,000 x g durante 10 min. Los sobrenadantes se mezclaron con 1 M HClO (1:1), se agitaron vigorosamente y se centrifugaron nuevamente a 16,000 x g. Luego se añadió un volumen de 0,8% p/v de ácido tiobarbitúrico a dos volúmenes del sobrenadante y se incubó a 90 °C durante 1 h. Las muestras se filtraron e inyectaron en un sistema de HPLC (módulo de suministro de disolvente Shimadzu LC-10ATvp) equipado con una columna Zorbax MicroSpher C-18 (100 mm × 4,6 mm, Agilent Technologies) y se detectó el MDA a $\lambda=590$ nm. Las condiciones de HPLC consistieron en un tampón en funcionamiento de 70% de buffer de 100 mM fosfato de potasio pH= 7,0 y 30% de metanol (v / v) según lo descrito por Templar y col. (1999). Los resultados se calcularon a partir de una curva estándar y se expresaron en nmol g⁻¹ PF.

Determinación del contenido de antioxidantes no enzimáticos

AA y dehidroascorbato

El contenido total y reducido de AA se midió en aproximadamente 150 mg de pericarpio de 3 frutos congelados y pulverizados con nitrógeno líquido. La extracción del AA reducido se realizó con una solución 3 % v/v de ácido trifluoroacético y se centrifugó a 16,000 x g durante 10 min, mientras que para el contenido total de AA además se realizó una incubación con DTT. Ambas formas se midieron con un sistema de HPLC (módulo de suministro de disolvente Shimadzu LC-10ATvp) equipado con una columna Zorbax MicroSpher C-18 (100 mm × 4,6 mm, Agilent Technologies) y se detectó a $\lambda=265$ nm (detector Shimadzu UV-vis SPD-10Avp) como se describe

MATERIALES Y MÉTODOS

en Bartoli y col. (2006). El ácido deshidroascórbico (la forma oxidada del ascorbato) se estimó como la diferencia entre el contenido de las formas totales y reducidas (Bartoli y col., 2006). Para calcular el estado redox del AA, se utilizó la siguiente fórmula: % DHA = $[(\text{contenido de DHA}) / (\text{contenido de AA} + \text{contenido de DHA})^{-1}] \times 100$. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF.

Glutación total y oxidado

El mismo homogenato utilizado para el AA se utilizó para las mediciones de glutación. Los contenidos de glutación total y oxidado se determinaron espectrofotométricamente (espectrofotómetro AV-160A Shimadzu, Japón) como se describe en Griffith (1980) en una mezcla de reacción que contiene 100 mM fosfato de potasio (pH=7,5), 5 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), 0,3 mM NADPH, 6 mM DTNB y 50 unidades de GR ml^{-1} . El glutación oxidado se midió después de incubar 100 μL de cada muestra con 2 μL de vinilpiridina. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF.

Determinación de actividad enzimática

Contenido de proteínas

Aproximadamente 200 mg de tejido pulverizado compuesto de 3 frutos se homogenizaron en 1 ml de buffer 100 mM bicina pH 7,5 conteniendo 10% v/v de glicerol, 1 nM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF de Sigma-Aldrich®), 1 μM E-64 (CAS No.: 66701-25- 5 de Sigma-Aldrich®) y 1 μM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA de Sigma-Aldrich®). PMSF, E-64 y EDTA se usaron como inhibidores de diferentes grupos de proteasas. El procedimiento se realizó en un baño de hielo y las muestras se mantuvieron a menos de 4 °C para evitar la desnaturalización de proteínas. Los homogeneizados se centrifugaron a 16,000 x *g* durante 10 minutos y los sobrenadantes se usaron para los ensayos enzimáticos realizados con un espectrofotómetro de registro UV-vis, modelo AV-160A Shimadzu®, Japón. Los homogeneizados se frizaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -20 °C hasta su uso. El contenido de proteína soluble total se midió de acuerdo con Bradford (1976) usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar de proteína. Las absorbancias se midieron usando un espectrofotómetro (espectrofotómetro AV-160A Shimadzu, Japón) a $\lambda=595$ nm. Los extractos resultantes fueron utilizados para el análisis de las actividades enzimáticas.

Actividad de catalasa (CAT)

Se midió de acuerdo con Bartoli y col. (1999), siguiendo la descomposición de H_2O_2 a $\lambda=240$ nm en un medio de reacción que consiste en buffer 50 mM fosfato de potasio pH=7,0, 15 mM H_2O_2 , 100 μL de homogeneizado (1 mg ml^{-1} de proteína) y 0,1% v/v Triton X-100.

Actividad de peroxidasas (PX)

Se midió por espectrofotometría a $\lambda=430$ nm según Bartoli y col. (1995), en un medio de reacción que consiste en buffer 50 mM fosfato de potasio pH=6, 5 mM pirogalol y 8 mM H_2O_2 . La actividad se calculó utilizando un coeficiente de extinción de $\epsilon=2,47 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Actividad de ascorbato peroxidasa (APX)

Se midió mediante una modificación del método descrito por Amako y col. (1994), a temperatura ambiente, en buffer de extracción 50 mM fosfato pH=7,0; 1 mM EDTA y 1 mM ácido ascórbico. La mezcla de reacción contenía buffer 50 mM fosfato pH=7,0; 0,5 mM ascorbato y 0,1 mM H_2O_2 . La actividad se midió durante 40 seg a intervalos de 5 seg, monitoreando la desaparición del AA en la muestra a una longitud de onda de $\lambda=265$ nm ($\epsilon = 2,8 \text{ mM/cm}$). La actividad se expresó en μmol de AA oxidado por minutos por mgr de Proteína.

Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

Se determinó debido a su capacidad para inhibir la reducción del tetrazolio nitroblue generado por la reacción de xantina-xantina oxidasa (Beauchamp y Fridovich, 1971), a temperatura ambiente. La mezcla de reacción contenía buffer 50 mM fosfato de potasio pH=7,8, 0,83 μM xantina y 0,015 mM EDTA. Se añadió una alícuota del extracto crudo de acuerdo con 0,2-1 unidades de SOD. La reacción se inició mediante la adición de una alícuota de la solución de xantina oxidasa (diluida de acuerdo con $\Delta E_{560} \cdot \text{min}^{-1} = 0,025$, para cada reacción). La actividad se siguió durante 40 s a $\lambda=560$ nm. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima que inhibe la reducción al 50%.

Actividad de NADPH oxidasa (NOX)

Se midió mediante una modificación del método descrito por Li y col. (2004), por quimioluminiscencia mejorada con lucigenina en un medio de reacción que contiene 50 mM fosfato de potasio pH=7,4, 5 μM lucigenina y 40 μM NADPH. La emisión de luz se midió cada 5 s durante 40 s utilizando un lector de microplacas multimodo CLARIOstar® Plus (Ortenberg, Alemania) en modo de luminiscencia.

Determinación de la expresión de genes

Se seleccionaron genes de síntesis y sensibilidad del etileno, entre los cuales se encuentran dos de síntesis de etileno: *ACO4* y *ACS6* y uno de receptores: *ETR3*, seis factores de transcripción relacionados con la síntesis de H₂O₂ y relacionados con la maduración de frutos: *NAC1*, *DREB1*, *JNBU1*, *HSP17.6*, *HSP20.1* y *HSP20.1*, además de un gen de referencia (o de normalización). Los cebadores utilizados para el análisis de expresión relativa fueron en algunos casos extraídos de la bibliografía o las secuencias fueron buscadas en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), y luego las secuencias ortólogas buscadas en el genoma de tomate disponible en la plataforma solgenomics (<https://solgenomics.net/>).

Diseño de cebadores

La herramienta de diseño PrimerQuest Tool del Integrated DNA technologies (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>), fue usado para el diseño de los cebadores. Los parámetros elegidos fueron: entre 85 – 150 pares de bases (pb) del amplicón, entre 18 y 25 pb del cebador, entre 59 y 63 °C de temperatura de fusión y una proporción de guaninas/citocininas de aproximadamente entre 40-60% (Fig. 7).

Nombre	Primer Forward (F)	Primer Reverse (R)
<i>ACO4</i>	TGATTGAGAAGACAGAAGAGGACA	GGAATTTGAGACCTGCATACAAC
<i>ACS6</i>	GGGAGTTGAAGTTGCAACAAA	CCTTGCTGGACCATAGGAGA
<i>ETR3/NR</i>	CCTTTGGCAAGGATGAGGAATA	GACAGTTCAGCCCAGTCATTAG
<i>JNBU1</i>	CGTGCACGTATGGTTGTTCTA	GTGCATCACTATGTTCCCAAATG
<i>DREB1</i>	GTTTGTGTGCCGTTGGATTATAG	CCCTTCCCTTCATTGTCTAGTT
<i>HSP17.6</i>	AGGTCAAGTCCATTGAGATTCTG	ACAGAGCAACTTCAAACCTTCCAAC
<i>HSP20.0</i>	AAGATTTAGCTTCCGGAGAATGC	GCCCATACAAGGATACCCTAAATTCACAT
<i>HSP20.1</i>	TAGGCTTCCAGGTACCAATTC	CCACTTTCACCTCCTCCTTCTT

Figura 7. Cebadores empleados en la cuantificación por PCR tiempo real.
Las secuencias nucleotídicas estas escritas en sentido 5´-3´.

Extracción de RNA total

Tejido del pericarpio fue pulverizado en nitrógeno líquido utilizando mortero estéril. Aproximadamente 200 mg de tejido fueron homogenizados en 1 ml de TRI Reagent® (Sigma-Aldrich®) y se homogeneizó vigorosamente empleando un vortex durante 15 seg para realizar la extracción de ARNm. Se retiraron las perlas de acero utilizando un magneto y se incubó el homogenato durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se realizaron dos incubaciones de 5min a temperatura ambiente con 200 µl cloroformo y centrifugado a 12000 x g 4 °C para conservar la fase acuosa, seguidas una incubación de 5 min con isopropanol (volumen igual al recuperado) y centrifugado por 15min a 12000 x g 4 °C para conservar el pellet, el cual fue

MATERIALES Y MÉTODOS

resuspendido en 100 μl de agua DEPC (Dietilpirocarbonato) y mezclado con cloruro de litio 8 M (1/3 del volumen de agua DEPC). La mezcla precipitó durante una noche a 4 °C. El pellet resultante fue lavado con 70% v/v etanol frío, centrifugado durante 10 min a 12000 $\times g$ a 4 °C, y secado en flujo laminar.

El pellet resultante fue tratado con una ADNasa (RQ1DNase, Promega®), de acuerdo con la especificación del fabricante, con una incubación adicional en isopropanol y lavado con 70 %v/v etanol frío. Por último, se resuspendió el pellet en 20 μl de agua DEPC y almacenado a -80 °C.

El contenido de ARN en cada muestra se cuantificó mediante el uso de un lector de microplacas multimodo CLARIOstar® Plus (Ortenberg, Alemania), midiendo la absorbancia de la muestra a $\lambda=260$ nm y 280 nm. Mientras que la integridad fue probada mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % (Fig. 8), a un voltaje constante de 70 V usando como buffer 0,5 X TBE. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su uso.

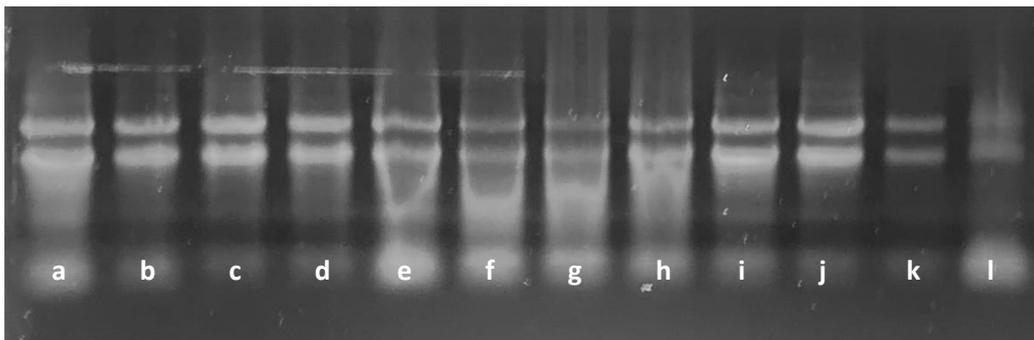


Figura 8. Gel de agarosa al 1% corrido por 45 min a 70 V.

Se observa la integridad del ARN de frutos de 4 estadios de maduración (MG, BR, OR y RR), de plantas WT (a, b, c y d), GGP-5261 (e, f, g y h) y GGP-49C12 (i, j, k y l).

Transcripción reversa

El ARN purificado fue usado para la síntesis de ADN complementario (ADNc) usando una transcriptasa reversa M-MLV (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega, 200 U μL^{-1}), 1 μl (50 pmoles μl^{-1}) de oligo dT (Oligo dT (15) Biodynamics®) y agua DEPC en cantidad necesaria para alcanzar un volumen de 15 μl . Posteriormente, se agregaron 5 μL de buffer de reacción M-MLV 5X, 1,5 μl de una mezcla de dNTPs 10 mM (dATP 100mM, dCTP 100mM, dGTP 100mM, dTTP 100 mM PB-L Productos Bio-Logicos®), 0,5 μl de inhibidor de ribonucleasas (Recombinant RNasin® 40u μl^{-1} Promega), 1 μL de enzima M-MLV y la cantidad necesaria de agua DEPC para alcanzar un volumen final de 25 μL . Luego la mezcla de reacción se

MATERIALES Y MÉTODOS

incubó durante 1 hora a 42°C para generar el ADNc. El ADNc generado se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.

PCR en tiempo real

Se pusieron a punto las concentraciones de cada juego de cebadores (Fig. 6), para obtener eficiencias de amplificación cercanas al 100% y se realizó una cuantificación relativa de la expresión de los cebadores a nivel de ARN mensajero mediante reacciones de amplificación en cadena por la ADN polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). Las mismas se llevaron a cabo utilizando un equipo StepOne Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando SYBR Green I como método de detección. Se siguieron las especificaciones del kit FastStart Universal SYBR Green Master Mix (Roche) para reacciones con un volumen final de 10 µL.

Análisis estadístico

Los datos representan un promedio de los resultados obtenidos de 5 experimentos independientes (primavera / verano 2017-2021), con un mínimo de 3 plantas para cada tratamiento. Para el análisis del tiempo de maduración, medido como el cambio de color, se analizaron 10 frutos (dos por planta), en cada experimento, para un n=30. Para los análisis bioquímicos y moleculares, cada n estuvo conformado por muestras compuestas por 3 frutos de plantas distintas y un n=2 para cada experimento, para un total de n=10, mientras que para los análisis ecofisiológicos se analizaron dos frutos por planta en cada estadio de maduración en dos experimentos para un n=20. Los resultados se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a un nivel de significancia de 0,05.

***CAPITULO I. EFECTO DEL BAJO CONTENIDO DE AA PRESENTE EN
PLANTAS DE TOMATE MUTANTES DEFICIENTES EN GDP-L-
GALACTOSA FOSFORILASA EN LA CALIDAD DEL FRUTO
DURANTE LA MADURACIÓN***

Antecedentes específicos

El desarrollo y crecimiento de los frutos están coordinados, entre otros sistemas, por hormonas vegetales a través de diferentes vías bioquímicas que desencadenan el proceso de maduración y determinan sus atributos. Entre las hormonas que regulan el cuajado, la división celular, la expansión celular y la maduración se encuentran las auxinas, las giberelinas, las citoquininas, los brasinoesteroides, el ácido abscísico (ABA) y el etileno (McAtee y col., 2013). Esta coordinación es particularmente evidente en la transformación de cloroplasto a cromoplasto durante la maduración, un evento caracterizado por la síntesis y acumulación de carotenoides, acompañando el cambio de color verde a rojo (Egea y col. 2011; Klee y Giovannoni, 2011). En general, los frutos frescos maduros contienen principalmente agua, azúcares, fibra dietética (de los componentes de la pared celular), ácidos orgánicos, minerales, pigmentos, antioxidantes, volátiles aromáticos y vitaminas, que contribuyen a la nutrición humana (Kader, 2008).

El fruto del tomate se reconoce como fuente importante de vitamina C (AA), en la dieta humana (Bhowmick y col., 2012), y debido a las múltiples funciones del ácido ascórbico como antioxidante (Foyer y Noctor 2011; Smirnoff 2018), ha generado interés como herramienta en la tecnología de la producción de frutos. El control de la síntesis y las funciones del ácido ascórbico se ha establecido a través del análisis de mutantes y plantas transgénicas de varias especies vegetales en diferentes partes de la ruta de biosíntesis (Alhagdow y col. 2007; Gilbert y col., 2009;2016). El ácido ascórbico se sintetiza a través de GDP-manosa y GDP-L-galactosa y la primera enzima en esta vía que se considera específica para la síntesis es GDP-L-galactosa fosforilasa (GGP), (Dowdle y col., 2007; Laing y col., 2007; Linster y col., 2007). Mutantes incapaces de producir ácido ascórbico no son viables pero pueden ser rescatados mediante la suplementación con ascorbato (Dowdle y col., 2007; Lim y col., 2016), mientras que otros con deficiencia de ácido ascórbico crecen con relativa normalidad, pero exhiben varios cambios sutiles en el desarrollo como una mayor sensibilidad al estrés ambiental y una mayor resistencia basal a los patógenos (Pavet y col., 2005; Barth y col., 2006; Senn y col., 2016; Caviglia y col., 2018; Plumb y col., 2018). La disponibilidad de plantas de tomate mutantes *Slgpp1*, con deficiencia de GGP1 y baja concentración de ácido ascórbico en hojas permite establecer el papel de esta enzima y del ácido ascórbico en la producción y calidad del fruto (Baldet y col., 2013), observándose un mayor daño en frutos cuando se exponen al frío (Wang y col., 2013; Yang y col., 2017), sin embargo, es evidente que la deficiencia de ácido ascórbico aún permite a las plantas realizar sus funciones esenciales. Debido a los pocos estudios enfocados en modificaciones a nivel del fruto, en el presente capítulo se evalúa los efectos de la mutación en

la GGP1 y la deficiencia de ácido ascórbico asociada en la calidad del fruto del tomate durante el cambio de color en el proceso de maduración.

En este capítulo se abordó el objetivo específico 1 que consistió en establecer el efecto del bajo contenido de AA presente en plantas de tomate mutantes deficientes en GDP-L-galactosa fosforilasa en la calidad del fruto durante la maduración.

En función de éste se fijaron tres actividades a realizar:

1. Determinar el contenido de ácido ascórbico y su estado redox en frutos de cuatro estadios de maduración de frutos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres.
2. Determinar el contenido de pigmentos y el tiempo de maduración de frutos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres.
3. Determinar parámetros de calidad en frutos en cuatro estadios de maduración de frutos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres.

Resultados

Contenido de ácido ascórbico y su estado redox en frutos silvestres y mutantes deficientes de ácido ascórbico durante la maduración

Al analizar el contenido de ácido ascórbico total en los tres genotipos, el genotipo silvestre y los dos mutantes deficientes en GGP1 (mutantes *Slgpp1*), se observó que la concentración de ácido ascórbico permaneció constante durante la maduración de los tres genotipos. En los frutos mutantes *Slgpp1* el contenido de ácido ascórbico es de alrededor del 30% del contenido de frutos silvestres, mientras que la concentración de la forma oxidada (estado redox %), disminuyó en frutos silvestres durante la maduración, mientras que se mantuvo constante en los frutos de ambos mutantes *Slgpp1* (Fig. 9).

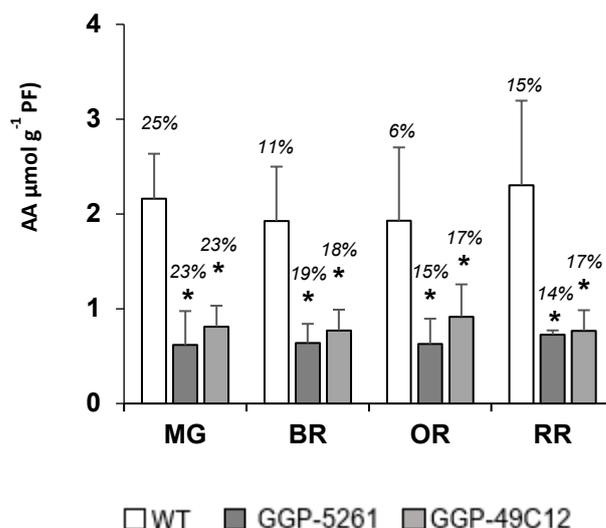


Figura 9. Contenido de ácido ascórbico y estado redox (%) en frutos silvestres (WT) y mutantes *Slgpp1*(GGP-5261 y GGP-49C12), en cuatro estadios de maduración.

Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Los datos se expresan en base al peso fresco. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos para la misma etapa de maduración y tratamiento. (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, $P \leq 0.05$).

Efecto de la deficiencia de ácido ascórbico sobre la acumulación de pigmentos y el tiempo de maduración

El contenido de clorofila *a* y *b* disminuyó durante la maduración de frutos silvestres y mutantes *Slgpp1* (Fig. 10a, b). Mientras que en los genotipos mutantes *Slgpp1* se observó mayor contenido de clorofila *a* en frutos de estadio MG y BR (Fig. 10a), y mayor contenido de clorofila *b* en el estadio BR (Fig. 10b), como consecuencia los frutos mutantes *Slgpp1* presentan mayor contenido de clorofila total en los estadios MG y BR durante la maduración. El contenido de carotenoides en frutos silvestres se mantiene constante durante la maduración, mientras que en los frutos mutantes *Slgpp1* en estadio MG y BR el contenido de carotenoides es mayor que en frutos silvestres (Fig. 10d).

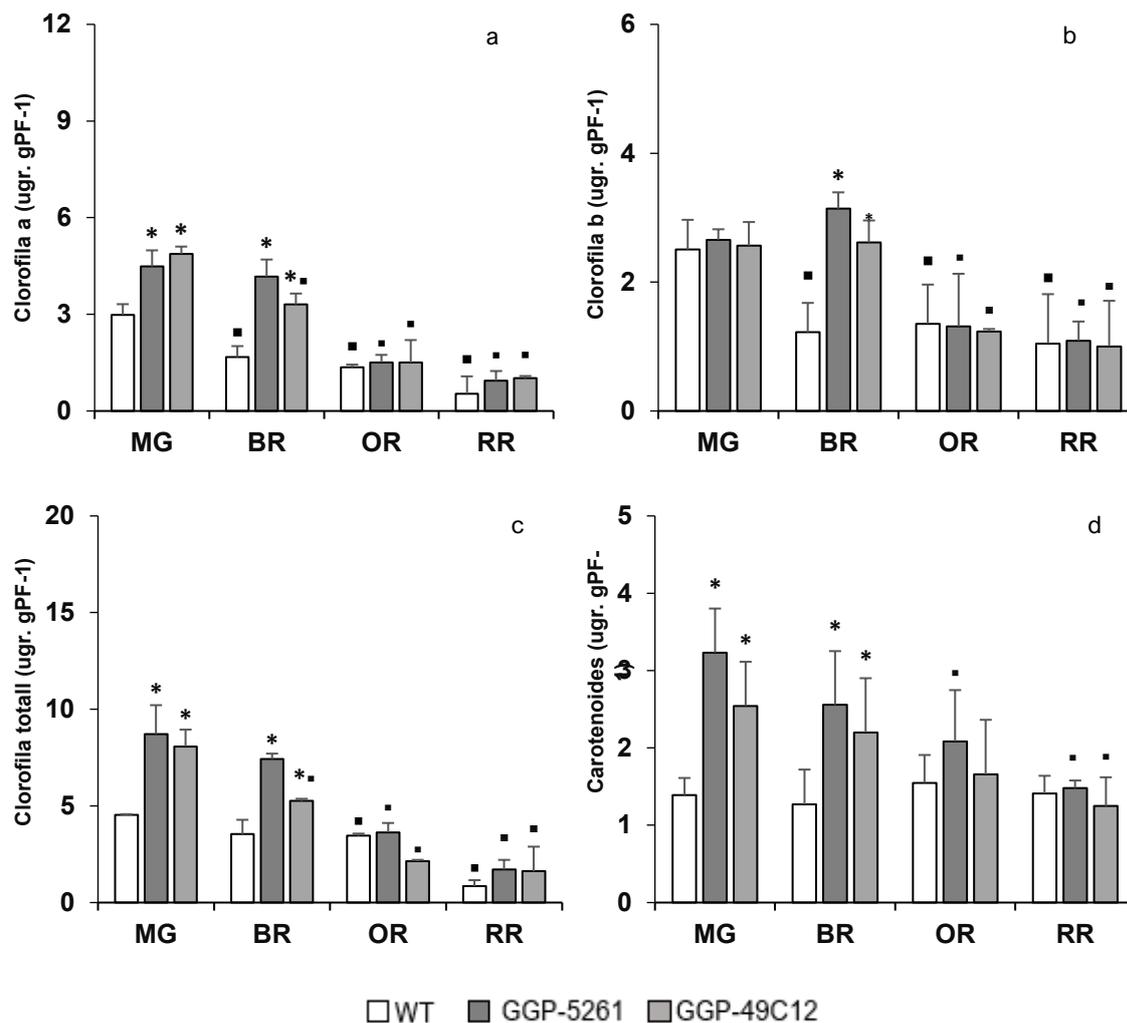


Figura 10. Contenido de pigmentos en frutos de plantas (WT) y mutantes *Slgpp1*(GGP-5261 y GGP-49C12), en cuatro estadios de maduración.

Contenido de clorofila *a* en tratamientos control (a), clorofila *b* (b), clorofila total (c) y carotenoides totales (d). Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Los datos se expresan en base al peso fresco. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos para la misma etapa de maduración y tratamiento. (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, $P \leq 0.05$).

La maduración en planta de frutos mutantes *Slgpp1* mostró un retraso con respecto a frutos silvestres. Analizando el tiempo que tardan los frutos para cambiar de color verde a rojo desde el estadio MG hasta RR se observó que los mutantes *Slgpp1* tardaron 3 días más que los frutos silvestres en alcanzar la etapa RR (Tabla 2).

	Control
WT	14,0 ± 0,5 a
GGP-5261	17,0 ± 1,0 b
GGP-49C12	17,0 ± 1,0 b

Tabla 2. Número de días para observar 50% de frutos rojos maduros (RR) en plantas silvestres y mutantes *Slgpp1*.

Letras minúsculas denotan diferencias estadísticas entre genotipos para el mismo tratamiento y las letras mayúsculas denotan diferencias estadísticas entre el mismo genotipo para diferentes tratamientos (ANOVA, $P \leq 0.05$). Los valores son la media de tres experimentos independientes.

Efectos de la deficiencia de ácido ascórbico en los parámetros de calidad del fruto durante la maduración

La respiración disminuyó durante la maduración del fruto de los tres genotipos analizados (Fig. 11a). Sin embargo, a pesar de que se observa una muy leve tendencia al aumento en la tasa respiratoria en el estadio OR de los tres genotipos analizados, el aumento en la tasa respiratoria característico en los frutos climatéricos no fue observado. La firmeza también disminuyó con la maduración, teniendo ambos mutantes *Slgpp1* valores más altos de firmeza que los frutos silvestres en el estadio RR (Fig. 11b).

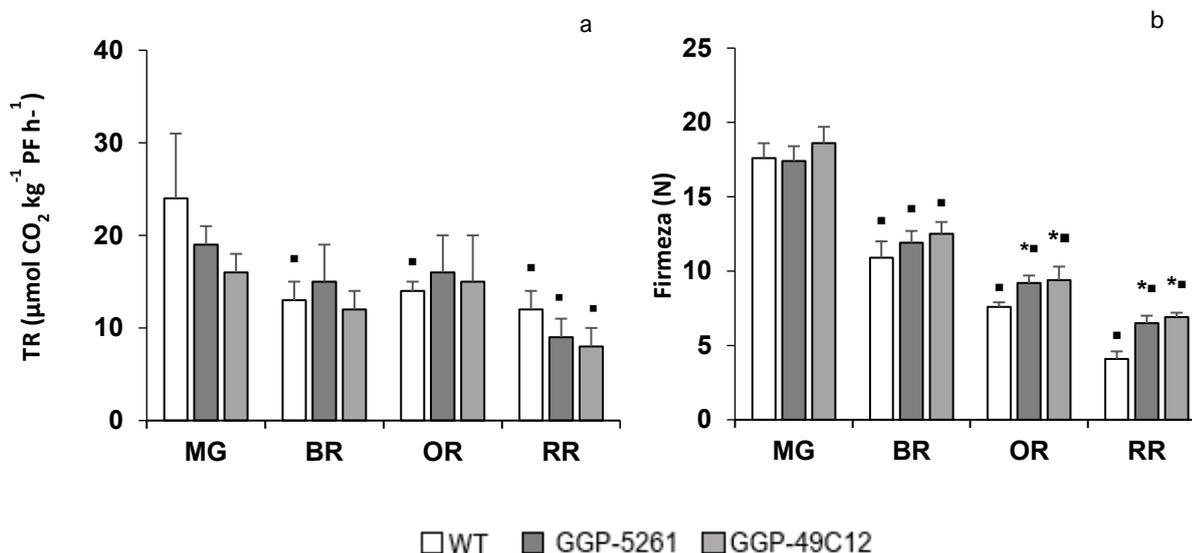


Figura 11. Tasa respiratoria (TR) y firmeza frutos silvestres (WT) y mutantes *Slgpp1* (GGP-5261 y GGP-49C12), durante la maduración.

Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Los datos de respiración se expresan en base al peso fresco. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos para la misma etapa de maduración y tratamiento. (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, $P \leq 0.05$).

Otros parámetros de calidad de los frutos registrados fueron el pH, el contenido de sólidos solubles totales y la acidez total titulable. Ninguno de los genotipos analizados mostró cambios en el pH durante la maduración del fruto (Fig. 12a), mientras que los sólidos solubles y la acidez titulable aumentan con la maduración en los tres genotipos analizados (Fig. 12b y c). Sin embargo, los mutantes *Slgpp1* presentan menor acidez titulable en los primeros estadios de maduración, haciendo que la proporción de sólidos solubles totales / acidez titulable (ratio) sea más alta en ambos mutantes *Slgpp1* que en silvestres (Fig. 12d)

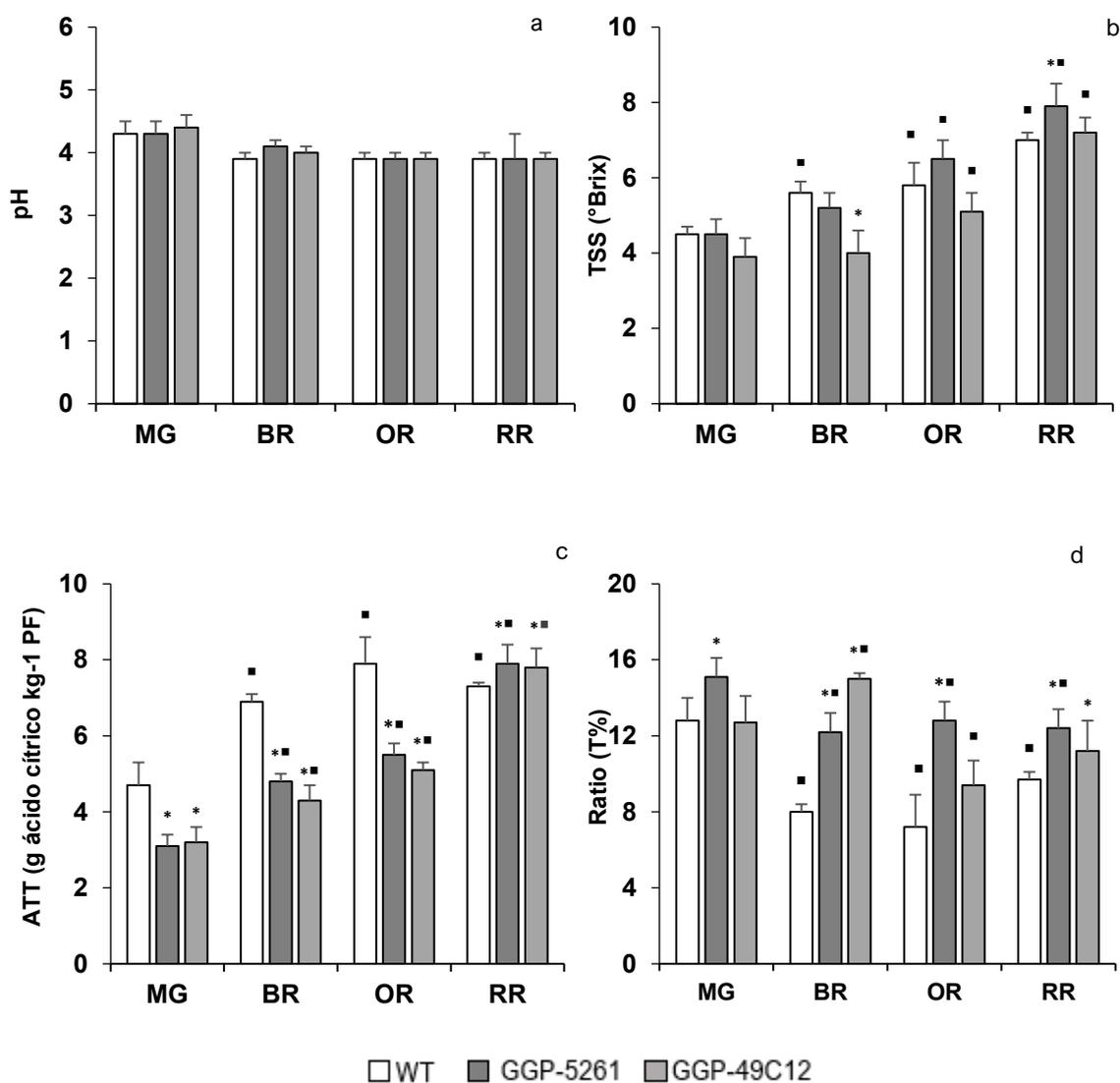


Figura 12. pH, sólidos solubles (TSS), acidez titulables (ATT) y ratio en frutos WT y mutantes *Slgpp1* (GGP-5261 y GGP-49C12), durante la maduración.

Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Los datos de respiración se expresan en base al peso fresco. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos para la misma etapa de maduración y tratamiento. (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, $P \leq 0,05$).

Discusión

El consumo de frutas y verduras con altos niveles de antioxidantes se considera un medio de prevención de enfermedades cardiovasculares y cáncer, lo que ha incrementado su demanda en los últimos años. El consumo de tomate, por su parte, ha sido estable a través del tiempo, lo que estimula su mejoramiento genético para la obtención de nuevos cultivares con altos contenidos en licopeno, β -caroteno y vitamina C (Adalid y col., 2007). A pesar de que el tomate podría considerarse como una fuente moderada de ácido ascórbico, en función de su contenido relativamente bajo (14 mg / 100 g de peso fresco), se consume ampliamente, representando la segunda fuente de vitamina C en la dieta humana (Fenech y col., 2019; Raffo y col., 2003). El cultivar Micro-Tom usado en el presente trabajo permitió establecer los efectos de la mutación de la enzima GDP-L-galactosa fosforilasa (mutantes *Slgpp1*), en el contenido de ácido ascórbico durante la maduración del fruto de tomate. Los frutos mutantes *Slgpp1* contienen aproximadamente un 30 % del ácido ascórbico total presente en frutos silvestres en los cuatro estadios de maduración analizados, lo cual se encuentra en concordancia con lo observado por Alegre y col. (2020), quienes evaluaron el contenido de ácido ascórbico y su estado redox en tres estadios de maduración (verde, pintón y rojo), y observaron una reducción del contenido en los estadios analizados en comparación con frutos silvestres. Durante las primeras etapas de desarrollo del fruto el contenido de ácido ascórbico proviene de la galactosa por la vía Wheeler-Smirnoff, mientras que en frutos maduros la acumulación de ácido ascórbico se relaciona con la vía del ácido galacturónico y por la traslocación desde las hojas debido a la condición del fruto como órgano destino (Badejo y col., 2012; Ioannidi y col., 2009). La enzima GDP-L-galactosa fosforilasa, es la primera enzima específica de la síntesis de ácido ascórbico dentro de la vía Wheeler-Smirnoff, por lo cual esta vía se encuentra parcialmente interrumpida en los mutantes *Slgpp1*. La acumulación de ácido ascórbico en estos mutantes podría deberse a la participación de la isoenzima GGP2 y a la vía de síntesis del ácido galacturónico como fue observado anteriormente tanto en frutilla, como en tomate (Agius y col., 2005; Badejo y col., 2012, respectivamente). Por otro lado, mientras que en los frutos silvestres el porcentaje de ácido ascórbico oxidado (DHA) disminuye durante la maduración, en frutos mutantes *Slgpp1* se mantiene constante. Una característica importante dentro de las propiedades del ácido ascórbico es su capacidad antioxidante y la finalización de reacciones en cadenas oxidativas que dan como resultado productos no oxidativos como dehidroascorbato (DHA) (Davey y col., 2000), por lo cual, la presencia de mayor porcentaje de DHA durante la maduración de frutos mutantes *Slgpp1*, estaría relacionado a la disminución de la capacidad antioxidante debido a la deficiencia de ácido ascórbico.

La degradación de la clorofila es el proceso más importante durante la senescencia de las hojas (Hendry y col., 1987), y durante la transición de cloroplastos a cromoplastos en el proceso de maduración de frutos (Brandt y col., 2006). Los frutos mutantes *Slgpp1* deficientes de ácido ascórbico utilizados en el presente trabajo presentan mayor contenido de clorofila y carotenoides, además de retraso en la maduración. Estos resultados están relacionados con el mayor contenido de clorofila y retraso de la senescencia en plantas de *Arabidopsis* mutantes para la GDP-l-galactosa fosforilasa (*vtc1* y *vtc2-1*), deficientes de ácidos ascórbico, observados por Pavet y col. (2005), quienes atribuyen estas características a que los mutantes *vtc1* son capaces de retener por más tiempo la clorofila. Durante la degradación de la clorofila está implicada la acción de las ROS generadas espontáneamente o de origen enzimático, estableciendo un complejo sistema antioxidante donde el ácido ascórbico está involucrado como mecanismo de defensa (Cadenas, 1985; Foyer y col., 2011). Sin embargo, el ácido ascórbico también está relacionado con la degradación de clorofilas en hojas de maíz, centeno y avena expuestas a la luz durante la senescencia (Pjon, 1981; Feierabend y Winkelhüsener, 1982; Del Longo y col., 1997, respectivamente), debido posiblemente a la su doble condición de prooxidante o antioxidante que le han sido atribuida (Kitts, 1997), dependiendo de las condiciones externas. A pesar de que no está claro el efecto del ácido ascórbico durante la degradación de la clorofila en la maduración de frutos, la mayor concentración de clorofila en frutos mutantes *Slgpp1* analizados en el presente trabajo durante la maduración estaría relacionado a la deficiencia de ácido ascórbico en concordancia con lo observado en hojas durante la senescencia y a que el metabolismo oxidativo y la generación de ROS se encuentra alterado en estos mutantes, aspecto que será analizado en el siguiente capítulo.

La característica de potente antioxidante del tomate se ha atribuido principalmente a los carotenoides del fruto (Sies y Stahl, 1998), y a pesar de que la síntesis de los mismos ocurre independientemente de la síntesis de clorofila en las plantas superiores (Roca y Pérez-Galvéz, 2021), el fruto en estadio MG como todo tejido fotosintético contiene carotenoides en estrecha asociación con la clorofila, lo cual estaría relacionando el mayor contenido de carotenoides totales observados en frutos mutantes *Slgpp1* durante la maduración observados en el presente trabajo. Por otro lado, el tiempo de maduración de los frutos hace referencia al cambio de color que se genera durante la transición de cloroplastos a cromoplastos y la acumulación de pigmentos responsables del color rojo dentro de éstos como el licopeno y β -caroteno (Brandt y col., 2006); en el presente trabajo se observa que frutos mutantes *Slgpp1* tardan más en cambiar de color en comparación con los frutos silvestres. Egea y col., 2011, establecieron que la formación de cromoplastos durante la maduración de frutos de tomate se da a partir de los

cloroplastos preexistente. Este retraso en la maduración de los frutos mutantes podría estar relacionada con la mayor concentración de clorofilas observadas en los estadios MG en comparación con los frutos silvestres, sin embargo, se reconoce un amplio número de factores internos y externos que determinan el tiempo que toma el fruto para cambiar de verde a rojo (Ilahy y col., 2019).

En general, durante la maduración de frutos climatéricos, como el tomate, se presenta un aumento en la tasa respiratoria, precedido por un aumento en la síntesis de etileno que se asocia al incremento en la expresión de enzimas como hidrolasas, transglicolasas, liasas y expansinas que participan en la degradación de la pared y en el consecuente ablandamiento del fruto (Osorio y col., 2011; Brummell y Harpster, 2001; Brummell, 2006; Harker y col., 1997; Rose y col., 2003). En estudios previos realizados a plantas de *Arabidopsis* (mutantes *vtc2-1*, *vtc2-4*) y posteriormente en frutos de tomate (mutantes *Slgpp1*), se observaron aumentos en la producción de etileno (Caviglia y col., 2018; Alegre y col., 2020, respectivamente). En el presente trabajo, a pesar de observarse una tendencia al aumento de la tasa respiratoria en los tres genotipos analizados en el estadio OR, esta no fue significativa, además no se observaron diferencias entre frutos mutantes *Slgpp1* y silvestres durante la maduración, sin embargo, frutos mutantes *Slgpp1* son más firmes en el estadio RR en comparación con frutos silvestres, como fue observado previamente por Alegre y col., (2020). Gilbert y col. (2009), observaron que plantas de tomate silenciadas para la GDP-D-manosa-3,5-epimerasa (primera enzima de la vía de síntesis del ácido ascórbico), con bajo contenido de ácido ascórbico presentan reducción en la firmeza del fruto. Esto lo atribuyen al posible vínculo entre la principal vía de síntesis del ácido ascórbico (Wheeler-Smirnoff) y la biosíntesis de la pared celular a través de la formación de GDP-D-manosa como paso inicial tanto para la biosíntesis del ácido ascórbico, como precursor de la biosíntesis de D-manosa, L-fucosa y L-galactosa y, por lo tanto, de hemicelulosas y pectina de la pared celular (Reiter y Vauzin, 2001; Gilbert y col., 2009; Mounet-Gilbert y col., 2016). En vista que dentro de la vía de síntesis de ácido ascórbico la actividad de la enzima GDP-L-galactosa fosforilasa está aguas debajo de la actividad de GDP-D-manosa-3,5-epimerasa, los resultados presentados en este capítulo indican que silenciar GME o GGP, además de reducir la biosíntesis de ácido ascórbico, también perjudica los procesos relacionados con el ablandamiento del fruto antes o después de la entrega de azúcares para la formación de la pared celular. Se han reportado otros mecanismos no enzimáticos como la acción de las ROS sobre las cadenas de polisacáridos que conforman la pared durante la maduración de los frutos (Airianah y col., 2016; Fry, 2004), que podrían tener importancia en el ablandamiento de la pared celular en los frutos

de las líneas mutantes *Slggp1* deficientes en ácido ascórbico durante la maduración, aspecto que será analizado en el siguiente capítulo.

Otro rasgo de calidad considerado durante la maduración del fruto es el sabor. Este rasgo está dominado principalmente por el contenido de azúcares (fructosa, sacarosa y glucosa) y la acidez (principalmente determinada por el contenido de ácidos cítrico y málico) (Kader, 2008). En algunos casos, los cultivares se aceptan en función del contenido de sólidos solubles totales (TSS) o la relación entre los sólidos solubles y la acidez titulable total (ATT), es decir, el ratio (T%), presente en el fruto maduro (Crisosto y col., 2005; 2007). A pesar de que no se observaron diferencias significativas en el pH durante la maduración, ni entre los tres genotipos analizados, tanto el contenido de sólidos solubles como la acidez titulable aumentan durante la maduración de frutos silvestres y mutantes *Slggp1*, sin embargo, al observarse menor acidez titulable total en frutos mutantes *Slggp1*, el ratio fue mayor en ambos genotipos deficientes de ácido ascórbico. Estos resultados sugieren que la mutación en la GGP1 y la disminución de la concentración de ácido ascórbico influyen en algunos aspectos de la calidad, sin embargo, algunos cambios en el proceso de maduración observados podrían no estar asociados con la concentración de ácido ascórbico, sino con el desajuste en su principal vía de síntesis.

CAPITULO II. EFECTO DE TRATAMIENTOS CON AA Y H₂O₂ EN LA VELOCIDAD DE MADURACIÓN DE FRUTOS DE PLANTAS DE TOMATE MUTANTES DEFICIENTES EN GDP-L-GALACTOSA FOSFORILASA CON BAJO CONTENIDO DE AA.

Antecedentes específicos

La diferenciación de los plástidos que tiene lugar durante la maduración de frutos es un proceso altamente coordinado que involucra componentes moleculares y hormonales programados (Giovannoni y col., 2017). Esto es particularmente evidente durante la transformación de cloroplasto a cromoplasto, un evento caracterizado por la síntesis y acumulación de carotenoides y degradación de clorofilas, acompañando el cambio de color verde a rojo en el fruto del tomate (Klee y Giovannoni 2011; Egea y col. 2011).

Se han observado incrementos en los niveles de ROS asociados a la transición de cloroplastos a cromoplastos durante la maduración del fruto de tomate (Jiménez y col., 2002), acompañado de un posible daño a lípidos y proteínas (Martí y col., 2009; 2011). Durante la maduración del fruto de diferentes especies, se han observado cambios en la actividad de superóxido dismutasa (enzima que cataliza la dismutación del radical superóxido a H₂O₂) y en los componentes del ciclo ascorbato-glutatión que reducen el H₂O₂ (Jiménez y col., 2002; Martí y col., 2009; Palma y col., 2015; Huan y col., 2016). Sin embargo, la evidencia genética y fisiológica sugiere que el H₂O₂ actúa como un segundo mensajero de señalización en las células vegetales, mediando la adquisición de tolerancia tanto al estrés biótico como al abiótico (Noctor y col., 2018). Además, Bouvier y col. (1998), demostraron que las ROS actúan como una nueva clase de segundo mensajero que regula la expresión de genes de biosíntesis de carotenoides del cromoplasto. Por lo tanto, si las ROS contribuyen a la maduración, controlar los procesos antioxidantes supondría mejorar la calidad y la extensión de la vida del fruto del tomate (Cocaliadis y col., 2014).

Como principal barrera a la acción de las ROS, el ácido ascórbico protege los carotenoides y regenera los tocoferoles, mientras que, como principal tampón redox en las plantas, está presente en altas concentraciones en la mayoría de los compartimentos celulares, incluido el apoplasto (Foyer y Noctor 2011); además, sirve como cofactor para muchas enzimas, como la violaxantina de-epoxidasa, que se requiere para la disipación no fotoquímica del exceso de energía de excitación en los fotosistemas. También es un donante de electrones en la reacción del ciclo ascorbato-glutatión donde la ascorbato peroxidasa (APX) cataliza la reducción del H₂O₂ (Asada, 1999). El análisis transcripcional de las hojas en el mutante *vtc1* (*Arabidopsis* deficiente en vitamina C) demuestra que el ácido ascórbico está asociado con proteínas implicadas en la unión del ADN, el control del ciclo celular, los procesos de señalización y desarrollo, metabolismo del carbono y la síntesis de la pared celular, lípidos y antocianinas (Pastori y col., 2003). Además, el ácido ascórbico también es un regulador de la división celular, el alargamiento y el crecimiento celular (De Simone y col., 2018), también se reconoce como una molécula transductora de señales; los cambios en la concentración de ácido ascórbico pueden modular la expresión de

genes que codifican para proteínas PR (del inglés Pathogenesis-Related), y por tanto la resistencia sistémica adquirida (Pavet y col., 2005). A pesar de que existe una estrecha interacción entre el metabolismo del ácido ascórbico con la respiración y la fotosíntesis observada en las hojas (Bartoli y col., 2006; 2009), con la síntesis de hormonas como el etileno y la acumulación de biomasa en la roseta en *Arabidopsis thaliana* (Caviglia y col., 2018), y con la síntesis de la pared celular y el rendimiento de frutos de tomate (Gilbert y col., 2009; Alegre y col., 2020), no se han realizado trabajos que establezcan el papel de ácido ascórbico durante la transición de cloroplasto a cromoplasto en la maduración del fruto de tomate. En el presente capítulo se examina el papel del ácido ascórbico modulando el estrés oxidativo generado por la síntesis de ROS durante las primeras etapas del cambio de color en la maduración del fruto de tomate, a través del uso de mutantes deficientes GGP1, con una fuerte disminución en el contenido de ácido ascórbico (llegando en este caso a un 30% del contenido de AA comparado con el silvestre).

En este capítulo se abordó el objetivo específico 2 que consistió en determinar el efecto de tratamientos con AA y H₂O₂ en la velocidad de maduración de frutos de plantas de tomate mutantes deficientes en GDP-L-galactosa fosforilasa con bajo contenido de AA.

En función de éste, se fijaron cuatro actividades a realizar:

1. Establecer tratamientos con AA y H₂O₂ en frutos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres.
2. Determinar el efecto de los tratamientos en el tiempo de maduración de frutos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres.
3. Determinar el efecto de los tratamientos en el contenido de H₂O₂ y daño a lípidos de frutos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres.
4. Evaluar el efecto de los tratamientos en la respuesta del metabolismo antioxidante de frutos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres.

Resultados

Efecto del ácido ascórbico y el H₂O₂ sobre el tiempo de maduración

Frutos de plantas mutantes *Slgpp1* mostraron un retraso en el tiempo de maduración, ya que tardaron aproximadamente 3 días más que los frutos de plantas silvestres en alcanzar el estadio RR desde el estadio MG (Tabla 3). Cuando se trataron con 20 mM de ácido ascórbico el tiempo de maduración de frutos mutantes *Slgpp1* fue equivalente al tiempo de maduración de frutos silvestres, mientras que, por el contrario, el tratamiento con 10 mM H₂O₂ alargó el tiempo de maduración en frutos mutantes *Slgpp1*, pero no en frutos silvestres (Tabla 3).

	Control	AA	H ₂ O ₂
WT	14.0 ± 0.5 aAB	12.0 ± 0.5 aA	15.0 ± 1.0 aB
GGP-5261	17.0 ± 1.0 bB	13.0 ± 0.5 aA	19.0 ± 1.5 bC
GGP-49C12	17.0 ± 1.0 bB	13.0 ± 0.5 aA	19.0 ± 2.0 bC

Tabla 3. Número de días para observar 50% de frutos rojos maduros en plantas silvestres y mutantes *Slgpp1* (mutantes GGP-5261 y GGP-49C12), en tratamientos control, 20 mM ácido ascórbico (AA) y 10 mM H₂O₂.

Letras minúsculas denotan diferencias estadísticas entre genotipos para el mismo tratamiento y las letras mayúsculas denotan diferencias estadísticas entre el mismo genotipo para diferentes tratamientos (ANOVA, P ≤ 0.05). Los valores son la media de tres experimentos independientes.

Concentración de ácido ascórbico y glutatión y su estado redox durante la maduración del fruto

La concentración de ácido ascórbico permaneció constante durante la maduración de los tres genotipos analizados, aunque en frutos mutantes *Slgpp1* el contenido de ácido ascórbico es de alrededor del 30% de frutos silvestres (Fig. 13a). Cuando se suministró ascorbato de forma exógena, la concentración de ácido ascórbico aumentó dos veces en los dos mutantes *Slgpp1*, mientras que permaneció sin cambios en frutos silvestres (Fig. 13b). El tratamiento con H₂O₂ no tuvo efecto sobre la concentración de ácido ascórbico en los frutos de los tres genotipos analizado (Fig. 13c). El estado redox del ascorbato (%), disminuyó en frutos silvestres durante la maduración, mientras que se mantuvo constante en los frutos de ambos mutantes *Slgpp1* (Fig. 13a). La suplementación con ácido ascórbico no tuvo un efecto significativo sobre el estado redox en frutos silvestres, mientras que disminuyó en las frutos mutantes *Slgpp1* en los estadios BR, OR y RR, disminuyendo así las diferencias entre los genotipos (Fig. 13b). Después del tratamiento con H₂O₂, el estado redox aumentó en los estadios BR y OR en frutos silvestres,

mientras que tendió a disminuir en frutos mutantes *Slgpp1*, especialmente en el estadio BR (Fig. 13c).

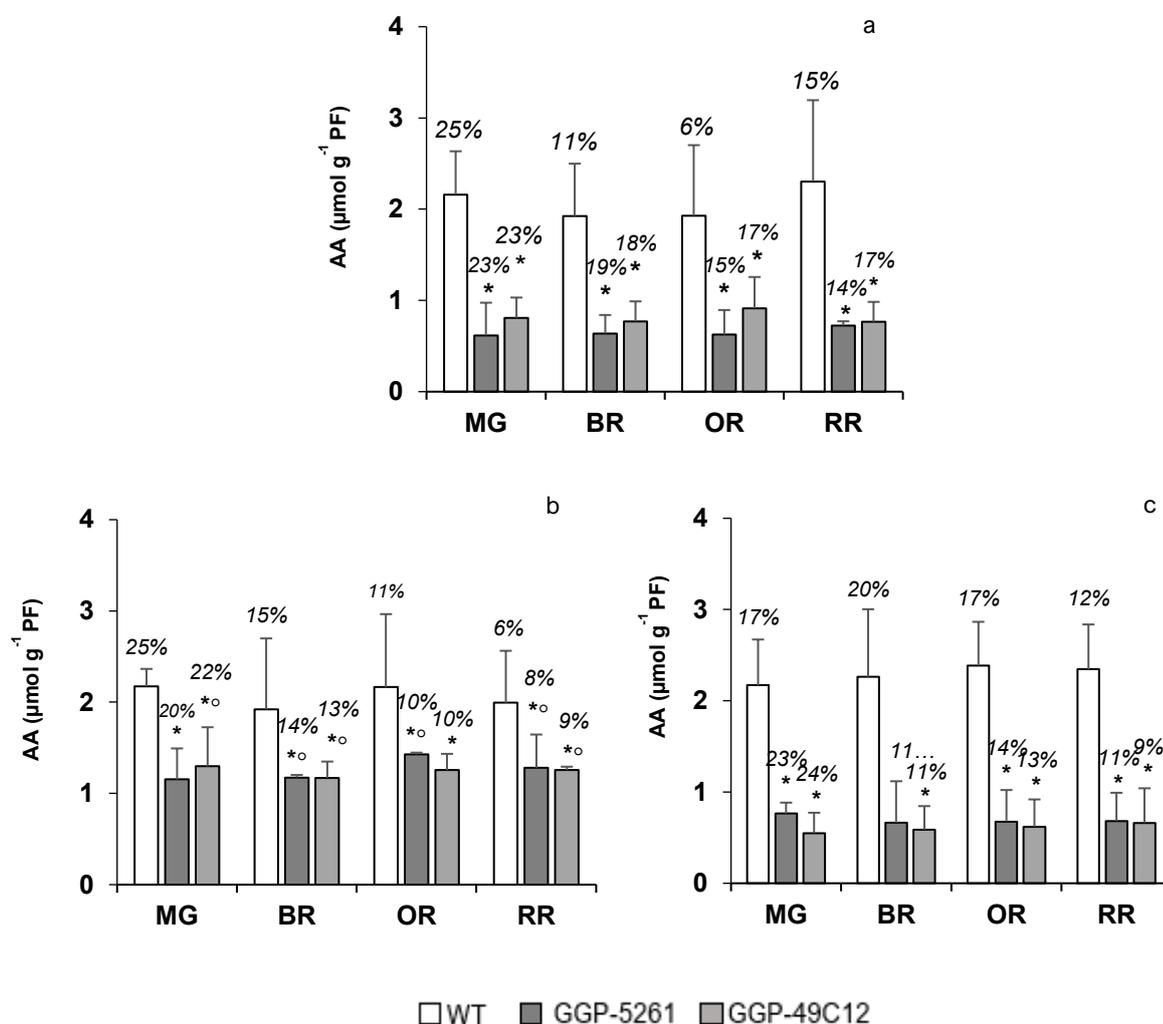


Figura 13. Contenido de ácido ascórbico y estado redox (%) en frutos control (a), y tratados con 20 mM de ácido ascórbico (b) y con 10 mM de H₂O₂ (c) de los tres genotipos analizados.

Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Los datos se expresan en base al peso fresco. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos para la misma etapa de maduración y tratamiento, (o) denota diferencias estadísticas entre el mismo genotipo y etapa de maduración para diferentes tratamientos y (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, $P \leq 0.05$).

El contenido de glutatión total se mantuvo constante durante la maduración del fruto en los tres genotipos analizados, pero los mutantes *Slgpp1* mostraron una mayor concentración de glutatión (Fig. 14a), en comparación con los frutos silvestres. Los tratamientos con ácido ascórbico no tuvieron efectos sobre el contenido de glutatión total de los frutos en los tres genotipos analizados, sin embargo, se observó una tendencia a disminuir el contenido de glutatión total con el tratamiento con H₂O₂ en los primeros estadios de maduración de frutos

mutantes *Slgpp1* (Fig. 14b, c). En frutos silvestres el glutatión se observa más oxidado que en frutos mutantes *Slgpp1* (Fig. 14a), mientras que el tratamiento con ácido ascórbico no afectó el estado redox del glutatión en frutos silvestres (Fig. 14b), y el tratamiento con H₂O₂ disminuyó el estado redox glutatión en frutos silvestres en todos los estadios de maduración analizados (Fig. 14c). Los tratamientos con ácido ascórbico y H₂O₂ redujeron el contenido de glutatión oxidado en estadios OR y RR de frutos mutantes *Slgpp1* (Fig. 14c).

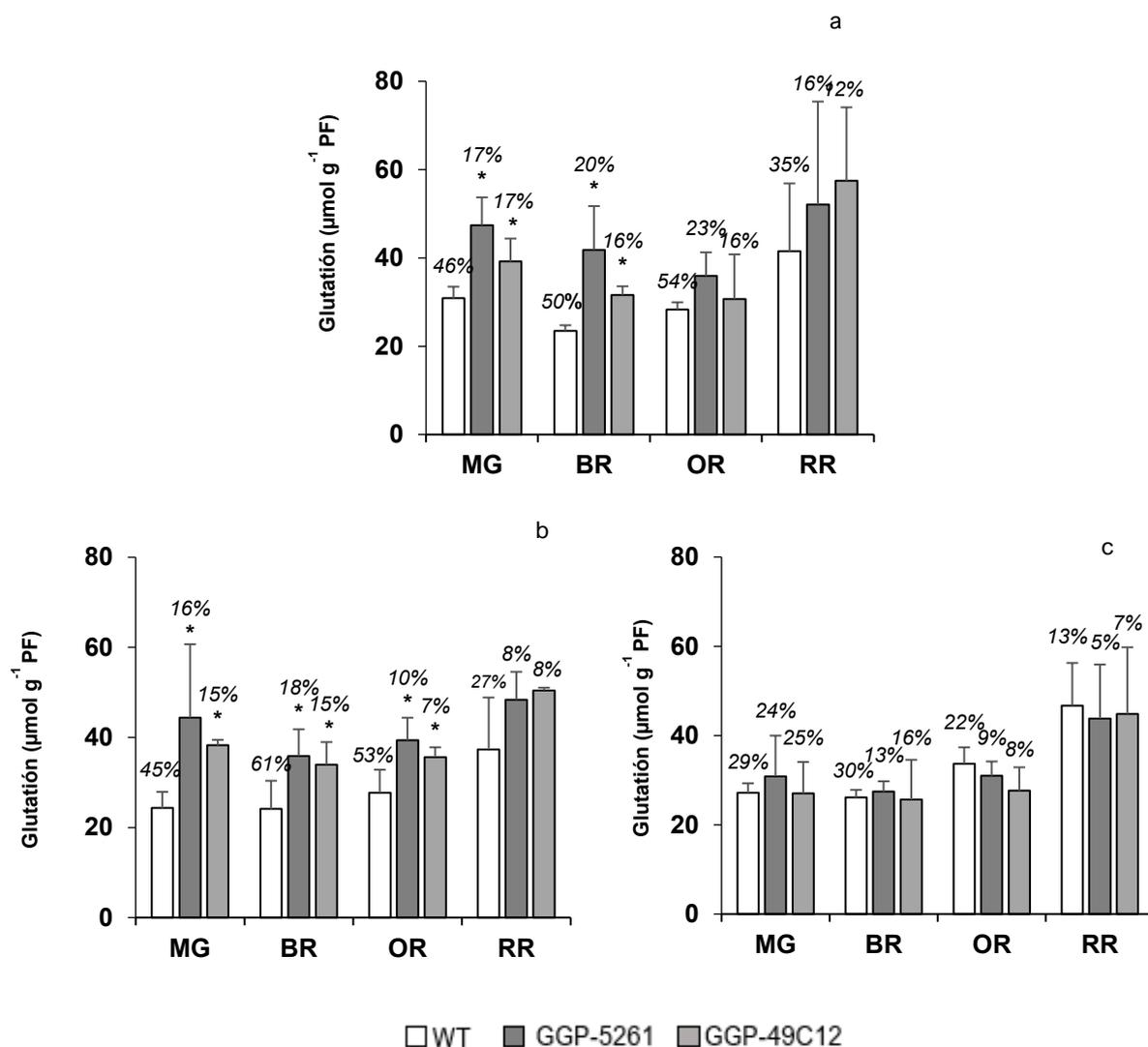


Figura 14. Contenido de glutatión y estado redox (%) en frutos control (a), y tratados con 20 mM de ácido ascórbico (b) y con 10 mM de H₂O₂ (c), de los tres genotipos analizados.

Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Los datos se expresan en base al peso fresco. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos para la misma etapa de maduración y tratamiento, (o) denota diferencias estadísticas entre el mismo genotipo y etapa de maduración para diferentes tratamientos y (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, P ≤ 0.05).

Metabolismo del H₂O₂ durante la maduración de frutos de tomate deficientes en ácido ascórbico

La producción de H₂O₂ aumentó progresivamente en frutos silvestres en los estadios MG y OR y luego disminuyó en RR. Tal patrón no se observó en los mutantes *Slgpp1*, por el contrario, en frutos mutantes GGP-49C12 tendió a disminuir durante la maduración (Fig. 15a). El tratamiento con ácido ascórbico no tuvo efecto sobre la producción de H₂O₂ en frutos silvestres, mientras que inesperadamente indujo un aumento significativo en la producción de H₂O₂ (3,5 veces en comparación con el control), en los estadios MG y BR en ambos mutantes *Slgpp1* (Fig. 15b). El tratamiento con H₂O₂ produjo una pequeña reducción en su síntesis en los estadios BR y OR de frutos silvestres, mientras que en frutos mutantes *Slgpp* indujo un aumento en el estadio MG seguido de una fuerte disminución en la etapa BR (Fig. 15c).

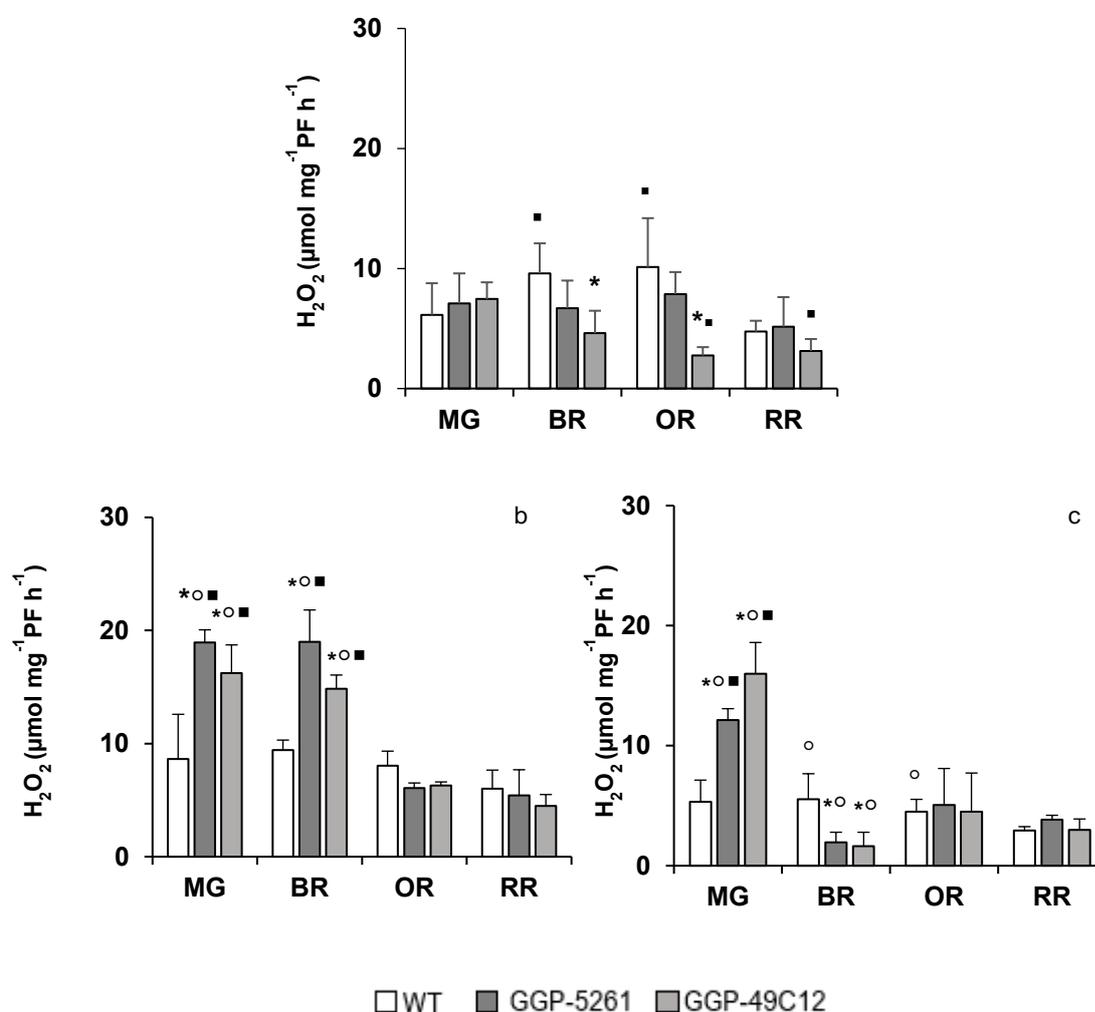


Figura 15. Producción de H₂O₂ en frutos control (a), y tratados con 20 mM de ácido ascórbico (b) y con 10 mM de H₂O₂ (c), de los tres genotipos analizados.

Los frutos fueron lavados con agua destilada y se midió la producción de H₂O₂ durante los siguientes 100 min. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos en la misma etapa de maduración y tratamiento, (o) denota diferencias estadísticas entre el mismo genotipo y etapa de maduración para diferentes tratamientos y (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, P≤0.05).

Aunque la oxidación de DCFDA, visualizada por microscopía confocal, no se puede usar para cuantificar la producción de ROS, es útil determinar en qué compartimento subcelular se produce H₂O₂. La Fig. 16 muestra la oxidación de DCFDA en todos los genotipos en el estadio BR, para los tres tratamientos. Los cloroplastos fueron los únicos orgánulos en los que se detectó H₂O₂ en las células de frutos silvestres y mutantes *Slgpp1*.

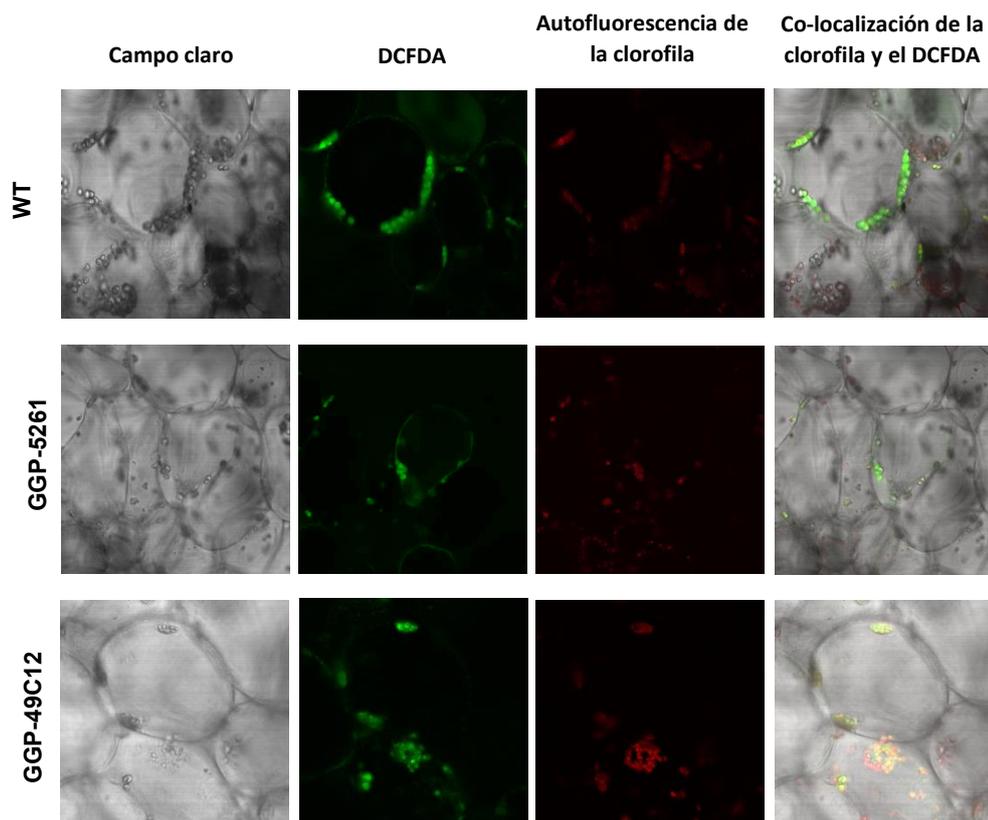


Figura 16. Tejidos de pericarpio de frutos de tomate en estadio BR analizados por microscopía confocal. La sonda DCFDA se utilizó para la detección de la localización subcelular de H₂O₂. Se muestran imágenes de campo claro, fluorescencia DCFDA 0,025 mM y autofluorescencia de clorofila en frutos silvestres, GGP-5261 y GGP-49C12. En todos los casos se observó co-localización de la señal DCFDA y autofluorescencia de clorofila.

El nivel de peroxidación lipídica (medida como concentración de MDA), se mantuvo constante en el tratamiento control en todos los estadios de maduración para los tres genotipos analizados; sin embargo, la concentración de MDA siempre fue mayor en frutos silvestres en comparación con los mutantes *Slgpp1*, y aumentando con la maduración (Fig. 17a). El tratamiento con ácido ascórbico redujo significativamente el nivel de peroxidación lipídica en frutos silvestres, principalmente en los estadios MG y BR (10 y 5 veces, respectivamente). El

efecto inverso se observó en las plantas mutantes *Slgpp1*, donde el contenido de MDA aumentó gradualmente hasta duplicarse en el estadio RR (Fig. 17b). El patrón de peroxidación lipídica con el tratamiento de H₂O₂ fue similar al tratamiento con AA y aumentó en todos los genotipos durante la maduración (Fig. 17c).

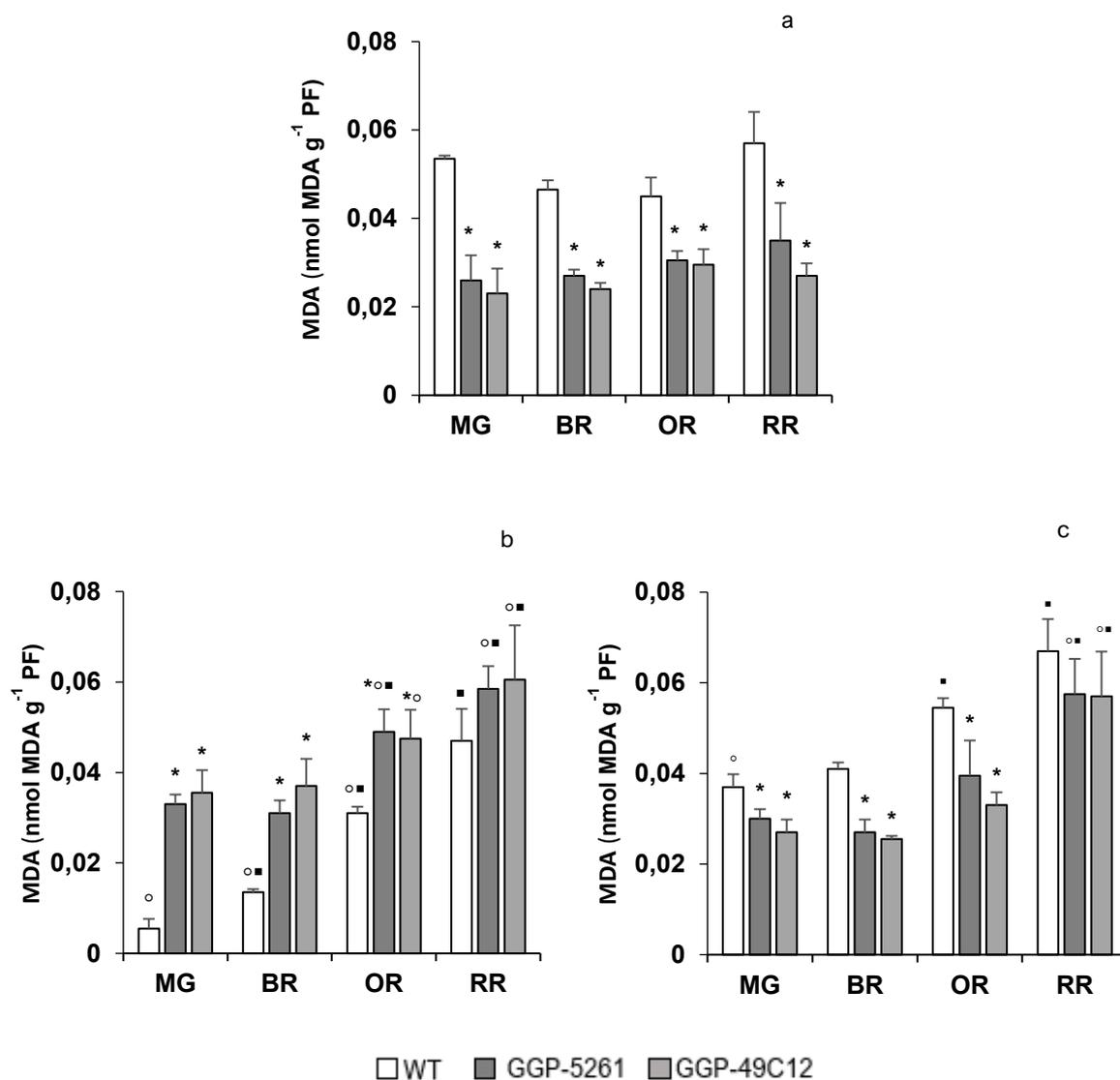


Figura 17. Peroxidación lipídica medida como contenido de MDA en frutos control (a), y tratados con 20 mM de ácido ascórbico (b) y con 10 mM de H₂O₂ (c), de los tres genotipos analizados.

Los frutos fueron lavados con agua destilada y se midió la producción de H₂O₂ durante los siguientes 100 min. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos en la misma etapa de maduración y tratamiento, (o) denota diferencias estadísticas entre el mismo genotipo y etapa de maduración para diferentes tratamientos y (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, P≤0.05).

Además de la síntesis *in vivo* de H₂O₂, analizada con Amplex Red, se ensayó la producción de ROS midiendo las actividades de NADPH oxidasa (NOX) y Superóxido dismutasa (SOD), durante

la maduración. En frutos silvestres la actividad de NOX mostró un pico en el estadio BR dos veces mayor que en los tomates mutantes *Slgpp1* (Fig. 18a), mientras que la aplicación de ácido ascórbico produjo un aumento en la actividad de la NOX en frutos silvestres en el estadio MG, pero no se observó ningún cambio en frutos mutantes *Slgpp1* (Fig. 18b). Los tratamientos con H₂O₂ provocaron aumentos en la actividad de NOX en ambos mutantes *Slgpp1* en el estadio BR que fueron más altos que en frutos silvestres (Fig. 18c).

Similar a la NADPH oxidasa, la actividad de SOD mostró un pico en frutos silvestres sólo en el estadio BR (Fig. 18d). El tratamiento con ácido ascórbico estimuló la actividad de esta enzima en mutantes *Slgpp1* alcanzando valores similares a los observados en frutos silvestres en el estadio BR (Fig. 18e). El tratamiento con H₂O₂ también produjo un aumento en la actividad de SOD en ambos mutantes *Slgpp1* en el estadio BR, y en todos los genotipos analizados en el estadio OR durante la maduración (Fig. 18f).

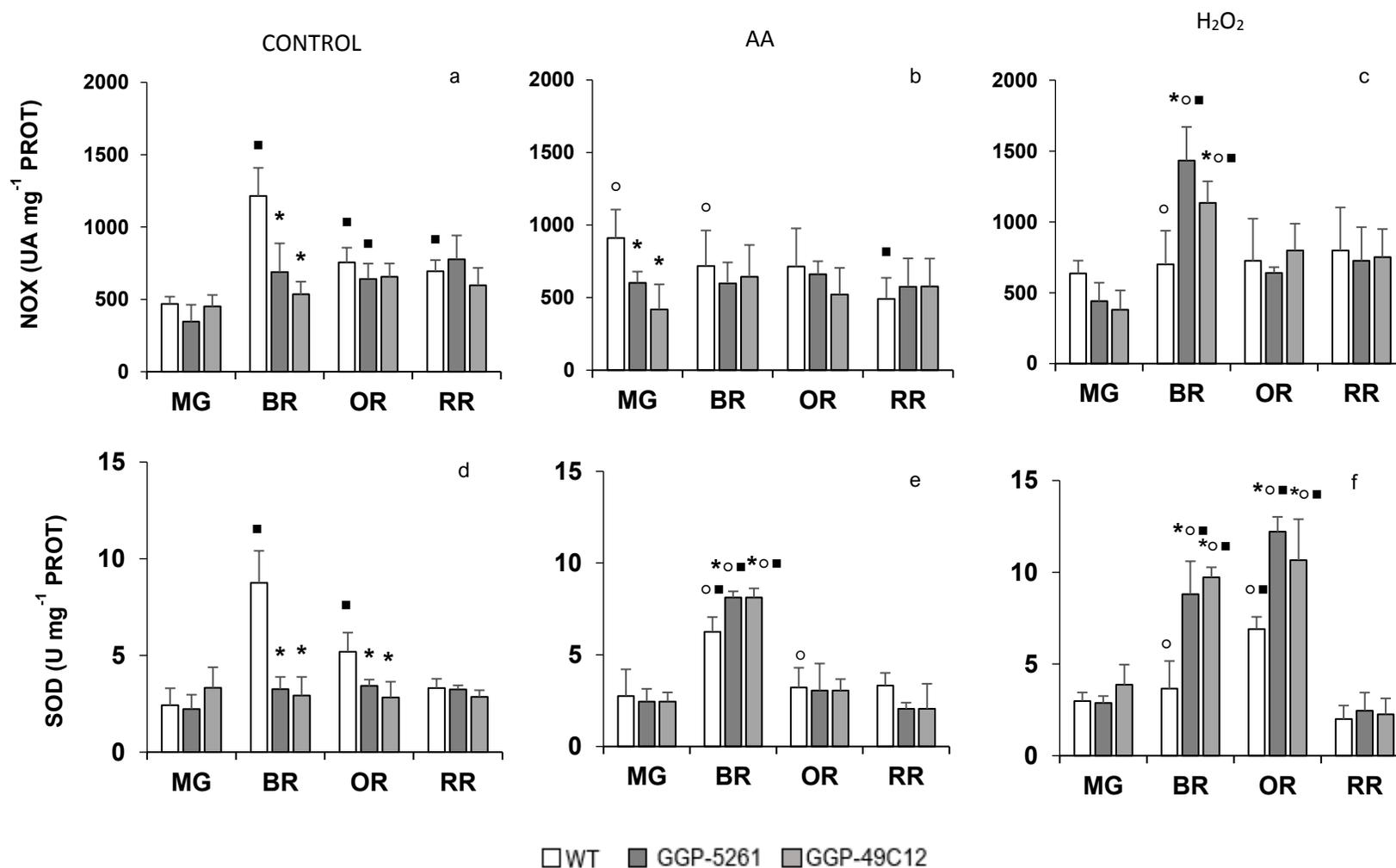


Figura 18. Actividad de NOX y SOD en frutos silvestres y mutantes *Slgpp1* en el tratamiento control (a, d), tratados con 20 mM ácido ascórbico (b, e) y con 10 mM H₂O₂ (c, f).

Letras minúsculas denotan diferencias estadísticas entre genotipos para el mismo tratamiento y las letras mayúsculas denotan diferencias estadísticas entre el mismo genotipo para diferentes tratamientos (ANOVA, P ≤ 0.05). Los valores son la media de tres experimentos independientes.

Para ensayar la capacidad de eliminación de H₂O₂ se midió la actividad de CAT, APX y PX. En el tratamiento control, la actividad de CAT mostró un pico en los estadios BR y OR solo en frutos silvestres, en contraste con los mutantes *Slggp1* que presentaron actividades similares a lo largo de la maduración (Fig. 19a). Los tratamientos con ácido ascórbico y H₂O₂ redujeron la actividad de CAT en el estadio MG de frutos mutantes *Slggp1*, mientras que el tratamiento con H₂O₂ aumentó la actividad de CAT en el estadio MG en frutos silvestres (Fig. 19b y c).

La actividad de APX aumentó en frutos silvestres en los estadios BR y OR, pero no en los frutos mutantes *Slggp1* en el tratamiento control (Fig. 19d). Esta tendencia no se observó en tomates suplementados con ácido ascórbico y H₂O₂, donde la actividad, en general, fue menor en todos los genotipos analizados (Fig. 19e). En particular, el tratamiento con H₂O₂ disminuyó la actividad de APX, pero la actividad aumentó en ambos mutantes *Slggp1* en los estadios RR (Fig. 19f).

La actividad de PX en tratamientos control no cambió durante la maduración de frutos silvestres, pero ambos mutantes *Slggp1* mostraron actividades más altas que los frutos silvestres de los estadios BR hasta RR y particularmente un pico en la etapa OR (Fig. 19g). La aplicación de ácido ascórbico redujo la actividad de PX evitando este pico en uno de los mutantes (Fig. 19h), mientras que el tratamiento con H₂O₂ produjo un aumento en la actividad de PX en ambos mutantes *Slggp1* en el estadio BR durante la maduración (Fig. 19i).

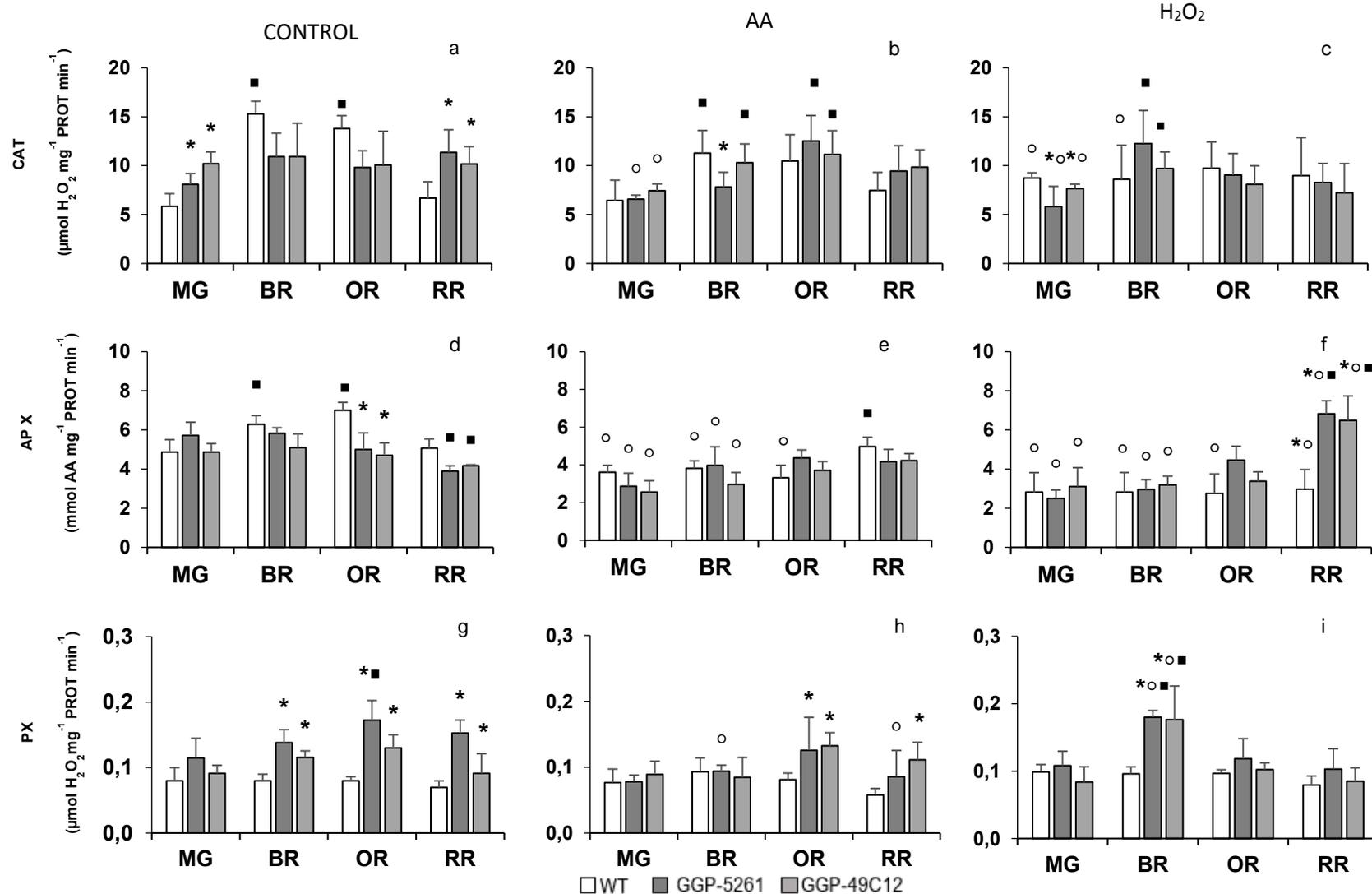


Figura 19. Actividad de CAT, APX y PX en frutos silvestres y mutantes *Slaap1* en el tratamiento control (a, d y g), y tratados con 20 mM ácido ascórbico (b, e y h) y con 10 mM H₂O₂ (c, f e i). Letras minúsculas denotan diferencias estadísticas entre genotipos para el mismo tratamiento y las letras mayúsculas denotan diferencias estadísticas entre el mismo genotipo para diferentes tratamientos (ANOVA, P ≤ 0.05). Los valores son la media de tres experimentos independientes.

Discusión

Los cambios en la producción o concentración de ROS y antioxidantes están asociados con la maduración del fruto; sin embargo, apenas se abordan sus funciones específicas. En este trabajo se utilizaron mutantes de tomate *Slgpp1*, con bajo contenido de ácido ascórbico, y tratamientos químicos exógenos para establecer las funciones de este antioxidante y del H₂O₂ durante la maduración del fruto del tomate.

Entre las funciones establecidas para el ácido ascórbico durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, se destaca su papel como antioxidante central soluble en agua, con funciones específicas principalmente en la fotosíntesis y en la expansión y división celular, además de actuar como cofactor de diversas enzimas (Foyer y col., 2020). Durante la maduración de frutos climatéricos como el tomate, en el que la maduración va acompañada de un pico en la respiración y en la producción de etileno, es ampliamente conocido el papel de enzimas como ACC sintasa y ACC oxidasa modulando la síntesis de etileno (Alexander y Grierson, 2002). Entre estas enzimas, la ACC oxidasa, que cataliza la formación de etileno, requiere ácido ascórbico (Dong y col., 1992). Sin embargo, a pesar de que se han generado varias plantas de tomate con regulación ascendente o descendente de la expresión génica de las enzimas de la vía de síntesis de ascorbato y también las de las vías de reciclaje (Amaya y col., 2014; Gilbert y col., 2009; Bulley y col., 2012, Cronje y col., 2012, Cai y col., 2015; Alhagdow y col., 2007; Zhang y col., 2013), la mayoría de los estudios que tratan los efectos de la deficiencia de ácido ascórbico en plantas se han centrado en las hojas y algunos en los frutos. Alegre y col. (2020), observaron que los frutos de ambos mutantes *Slgpp1* muestran una mayor producción de etileno, sin embargo, hay una falta de información sobre las consecuencias de la modificación del contenido de ácido ascórbico en el momento de la maduración de frutos. Dos mutantes *Slgpp1* que producen frutos cuyo contenido de ácido ascórbico es aproximadamente 3 veces menor que los frutos de plantas silvestres fueron usados para establecer la función del ácido ascórbico durante la maduración del fruto. Esta deficiencia en el contenido de ácido ascórbico fue asociada con un retraso en el tiempo de maduración de los frutos desde el estadio MG hasta RR en comparación con frutos silvestres (Tabla 3, cap. 3). En el presente capítulo, el tratamiento con ácido ascórbico reestablece el tiempo de maduración en ambos mutantes *Slgpp1*, demostrando la participación de este metabolito en la maduración de frutos de tomate.

Además de la reconocida función como antioxidante del ácido ascórbico, su papel junto con el glutatión formando el ciclo del ascorbato-glutatión (vía Halliwell-Asada), involucra a ambas moléculas en la regulación de los procesos de desarrollo de las plantas a través de la manipulación del metabolismo oxidativo (Asada, 1999; Pignocchi y Foyer, 2003). En el presente

trabajo se observa que los frutos mutantes *Slgpp1* tienen mayor contenido de glutatión y menor porcentaje de glutatión oxidado durante la maduración. Pavet y col. (2005), observaron que hojas de mutantes *vtc* de *Arabidopsis*, deficientes en el contenido de ácido ascórbico, tienen un mayor contenido de glutatión que plantas silvestres, relacionado a la activación de las respuestas al estrés innatas de las plantas a través del metabolismo antioxidante ante la deficiencia de ácido ascórbico. La importancia antioxidante del ciclo AA-GSH neutralizando el H₂O₂ en orgánulos activos redox como las mitocondrias y los peroxisomas, así como en el citosol, está representada principalmente por las reservas de ácido ascórbico y glutatión (Bray y col., 2000). El mayor contenido de glutatión en frutos mutantes *Slgpp1* observada en el presente trabajo respondería a un posible restablecimiento en la capacidad de balance redox ante la deficiencia de ácido ascórbico.

El aumento en el estado estacionario de ROS al comienzo de la maduración del fruto del tomate está bien demostrado por varios estudios. Jiménez y col. (2002) observaron un aumento de H₂O₂ y daño oxidativo en la etapa de transición de cloroplasto-cromoplasto durante el cambio de color. Del mismo modo, Kumar y col. (2016) observaron un pico de H₂O₂ en el estadio BR durante la maduración del tomate y Brennan y Frenkel (1977) demostraron la participación del H₂O₂ en el inicio y promoción de la maduración de peras. En el presente trabajo, la producción de H₂O₂ *in vivo* aumentó durante la transición en los estadios MG a OR sólo en frutos silvestres. Barsan y col. (2012), en un estudio proteómico observaron un aumento de las proteínas sensibles al estrés asociadas con las vías redox, como los componentes del ciclo ascorbato-glutatión o las proteínas de choque térmico durante la transición de frutos verdes a rojos. Sin embargo, la producción de ROS puede ser un evento secundario asociado o, por el contrario, puede ser una señal activa que promueve los procesos asociados a la maduración (Decros y col., 2019). Inesperadamente, la suplementación con ácido ascórbico provocó un aumento en la producción de H₂O₂. Aunque el ácido ascórbico tiene una función central como antioxidante, también puede tener una función prooxidante. Esta actividad generadora de ROS depende de su concentración y de la presencia de metales de transición como Fe³⁺ y Cu²⁺ (Buettner y Jurkiewicz, 1996). Asociado con este aumento en la producción de H₂O₂, se acortó el tiempo de maduración en ambos mutantes *Slgpp1*, mientras que el tratamiento con H₂O₂ provoca disminución de su propia producción en el estadio BR, retrasando la maduración del fruto en plantas de ambos mutantes *Slgpp1*.

El aumento de la oxidación puede ser un componente clave de la señalización de ROS, sin embargo, la ausencia de un vínculo entre el contenido de MDA y los estados redox de los antioxidantes (es decir, glutatión y ascorbato), con cambios en el tiempo de maduración sugiere

que el daño oxidativo no es un determinante clave para la maduración del fruto y refuerza la evidencia de que el H₂O₂ en sí mismo representa una señal involucrada en maduración. La estabilidad relativamente alta del H₂O₂ en las células es crucial para su acumulación y función en diferentes compartimentos de células vegetales (Foyer y Noctor, 2016). La alta estabilidad permite la difusión de H₂O₂ a diferentes organelas para proporcionar señalización al impactar en la expresión génica (Galvez-Valdivieso y Mullineaux, 2010).

Los cloroplastos, las mitocondrias, los peroxisomas y el apoplasto representan los principales sitios subcelulares de producción de ROS (Noctor y col., 2018). Las cadenas de transporte de electrones fotosintéticas y respiratorias se consideran las principales fuentes de ROS en los cloroplastos y las mitocondrias, respectivamente. En los peroxisomas, el H₂O₂ es producido por enzimas asociadas con el metabolismo fotorrespiratorio. Además, las actividades de NADPH oxidasa y SOD asociadas, también pueden contribuir a la acumulación de H₂O₂ en el apoplasto de las células vegetales. Para determinar los sitios subcelulares de producción de H₂O₂, se realizó microscopía confocal en el tejido del pericarpio de los frutos. Este análisis demuestra que la producción de H₂O₂ en los frutos, en los diferentes tratamiento realizados, coincide con la localización de la clorofila, lo que indica que la producción principal de H₂O₂ tiene lugar en los cloroplastos. El desmantelamiento de las membranas tilacoides observado durante la transición de cloroplasto a cromoplasto (Barsan y col. 2012), puede causar un aumento en la generación de ROS. Además, el aumento en las actividades de NADPH oxidasa y SOD en los frutos silvestres indican que podrían participar en la producción de H₂O₂ en los estadios BR. Además, la ausencia de oxidación de DCFDA en el apoplasto sugiere que la producción de H₂O₂ en este compartimento puede ser muy baja, sin embargo, no significa que esté ausente durante la maduración del fruto, puesto que al igual que en la germinación de semillas, un vínculo controlado entre el ascorbato y las hormonas es evidente en el crecimiento y maduración del fruto, donde el ácido ascórbico en el apoplasto genera ROS que promueven la maduración (Green y Fry, 2005; Gapper y col., 2013), y dan como resultado la degradación de polisacáridos que provoca el ablandamiento del fruto (Dumville y Fry, 2003). Estos resultados se relacionan al mantenimiento de la firmeza en frutos mutantes *Slgpp1* observados en el capítulo I, indicando que los efectos en la calidad de éstos se deben al desajuste en el metabolismo oxidativo generado por la deficiencia de ácido ascórbico.

La concentración de H₂O₂ en los tejidos vegetales depende del equilibrio entre su producción y su degradación, controlada a través del metabolismo oxidativo y la actividad antioxidante (Gupta y col., 2018). Colville y Smirnoff (2008), observaron que plantas de *Arabidopsis* con bajo contenido de ácido ascórbico muestran una actividad antioxidante alterada. De manera similar,

en el presente trabajo las plantas de tomate *Slgpp1* además de presentar mayor contenido de glutatión presentan mayor actividad de catalasa y peroxidasa que pueden evitar el pico de acumulación de H₂O₂ observado en frutos silvestres no tratados. Los tratamientos con ácido ascórbico y H₂O₂ aumentan o disminuye la producción de H₂O₂, respectivamente, en el estadio BR. El sistema ascorbato peroxidasa-glutatión reductasa (APX-GR) es mucho más eficiente en la remoción del H₂O₂ que la actividad de la catalasa (CAT) y la peroxidasa (PX) (Dolatadian y Jouneghani, 2009). En este sentido, la participación de la vía Halliwell-Asada (ascorbato-glutatión), en la neutralización del H₂O₂ es ampliamente reconocida en plantas (Bray y col., 2000), sin embargo, las modificaciones en la producción de H₂O₂ no se pueden explicar por el cambio en la actividad de un antioxidante en particular, sino que pueden resultar del equilibrio de estos, como las actividades CAT, APX o PX y el contenido de glutatión medido en este trabajo, más aún si se toma en cuenta que en el presente trabajo los tratamientos con H₂O₂ aumentaron el daño a lípido y disminuyeron el contenido glutatión, demostrando el reconocido papel del H₂O₂ como molécula relacionada al estrés en ciertas condiciones (Foyer y col., 2013). A pesar de que se deben realizar nuevos experimentos con métodos más precisos para determinar la participación de ROS producidos en el apoplasto en la maduración de frutos, tomados en conjunto, estos resultados sugieren la participación del H₂O₂ en la transición de cloroplasto a cromoplasto en frutos del tomate durante la maduración.

***CAPITULO III. EFECTO DEL BAJO CONTENIDO DE AA EN LA
MADURACIÓN MODULADA POR ETILENO DE FRUTOS DE
PLANTAS DE TOMATE MUTANTES DEFICIENTES EN GDP-L-
GALACTOSA FOSFORILASA.***

Antecedentes específicos

El fenómeno de maduración de frutos es un evento altamente coordinado que ocurre al cambiar los niveles de expresión de cientos de genes que generan cambios bioquímicos. Para controlar con precisión el proceso de la maduración es importante comprender el papel del etileno e integrar la información relativa a su biosíntesis y percepción, además de ampliar el conocimiento de la regulación de la maduración independiente del etileno.

Desde hace tiempo el tomate ha sido usado como sistema modelo en el estudio de las bases moleculares del desarrollo de frutos carnosos, revelando el rol del etileno en el control de la maduración de frutos climatéricos (Pirello y col., 2009). El etileno es una fitohormona gaseosa que regula el crecimiento, el desarrollo y las respuestas al estrés de las plantas (Chang, 1996), producida de la S-adenosilmetionina, que se convierte en ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato), por la ACS (1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa), y el ACC es finalmente oxidado por la ACO (1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa), en etileno. Para mantener altos niveles de producción de etileno, la metionina se recicla en un camino circular (Yang y Hoffman, 1984). Durante su vía de señalización, el etileno es percibido por una familia de receptores específicos ubicados en el retículo endoplasmático rugoso, que regulan negativamente la señalización del etileno. La unión con el etileno le produce al receptor un cambio conformacional que resulta en la inactivación de una proteína de tipo MAP quinasa (llamada CTR1), unida al dominio intracelular de éste (Kieber y col., 1993). La inactivación de CTR1 resulta en la activación de un receptor intracelular, llamado EIN2. Este receptor es capaz de activar dos factores de transcripción llamados EIN3 y EIL1. Estas proteínas ERF (del inglés ethylene response factors), al unirse a las secuencias de ADN que actúan como sus blancos, inducen la transcripción de toda una serie de genes que en última instancia son los que en conjunto generan “la respuesta al etileno” (Guzman y Ecker, 1990; Ecker, 1995; Bleecker y Schaller, 1996; Chang C, 1996; Kieber, 1997; Chen y col., 2005).

Durante la maduración de frutos, en un principio las ROS se describieron como generadoras de daño celular debido al aumento de sus niveles estacionarios medidos en los primeros estadios de la maduración (Cocaliadis y col., 2014). Sin embargo, en los últimos años, un número creciente de estudios ha revelado que las ROS controlan muchos procesos biológicos vegetales diferentes, como la división celular, el crecimiento de las raíces, las respuestas al estrés y el desarrollo y maduración de frutos (Dietz y col., 2016; Gupta y col., 2016; Waszczak y col., 2018; Considine y Foyer, 2021), que junto con la existencia de mecanismos de eliminación de ROS, como los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Jiménez y col., 2002; Martí y col., 2008;

Mateos y col, 2013; 2015; Huan y col. 2016), observados también en frutos, soportan la idea de una función dual de las ROS.

Por otro lado, el efecto del etileno en el metabolismo antioxidante fue analizado durante la maduración del fruto de mago por Wang B y col. (2009), quienes observaron que la aplicación exógena de etileno estimula y la aplicación de 1-MCP inhibe la producción de H₂O₂, mientras que la aplicación de etileno disminuye y la aplicación de 1-MCP mantiene alto el contenido de ácido ascórbico durante la maduración del fruto. Sin embargo, a pesar del reconocido papel de esta hormona en controlar la maduración de frutos climatéricos y del aumento de los niveles de ROS durante la maduración de frutos de tomate (Jiménez y col., 2002), la relación entre estos compuestos y el ácido ascórbico no está clara, sobre todo al demostrarse el retraso en la maduración y la reducción en los niveles de H₂O₂ en frutos con bajo contenido de ácido ascórbico (Capítulo I del presente trabajo). Por lo tanto, establecer conexiones entre los mecanismos por los cuales el etileno y el ácido ascórbico regulan la acumulación de ROS, es fundamental para comprender el papel de las ROS durante la maduración de frutos.

En este capítulo se abordó el objetivo específico 4 que consistió en establecer el efecto del bajo contenido de AA en la maduración modulada por etileno de frutos de plantas de tomate mutantes deficientes en GDP-L-galactosa fosforilasa.

En función de éste, se fijaron cuatro actividades a realizar:

1. Exponer los frutos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres a un precursor de la síntesis de etileno (ACC), y a un inhibidor de la señalización de etileno (1-MCP).
2. Determinar el tiempo de maduración de frutos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres.
3. Evaluar la respuesta del metabolismo antioxidante de frutos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres.
4. Determinar la producción de H₂O₂ y el daño a lípidos de frutos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres.

Resultados

Efectos del ACC y 1-MCP durante la maduración de frutos deficientes de ácido ascórbico
El etileno ha sido ampliamente usado para acelerar la maduración de frutos. En el presente trabajo se observó que el tratamiento con ACC adelanta la maduración de frutos silvestres y mutantes *Slgpp1* (Tabla 4), en 4 días para frutos silvestres y 6 días para frutos mutantes *Slgpp1*. Por otro lado, el 1-MCP retrasa la maduración de los tres genotipos analizados a los 5 días para frutos silvestres y a los 2-3 días en los mutantes *Slgpp1* (Tabla 4).

	Control	0,5mM ACC	Control	8ppm 1-MCP
WT	14,0 ± 0,5 aB	10,0 ± 1.0aA	12,0 ± 0,5 aA	17,0 ± 0,5 aB
GGP-5261	16,0 ± 0,5 bB	13,0 ± 0.5bA	15,0 ± 0,5 bA	17,0 ± 0,5 aB
GGP-49C12	17,0 ± 1,0 bB	15,0 ± 0.5 bA	14,0 ± 1,0 bA	17,0 ± 0,5aB

Tabla 4. Número de días para observar 50% de frutos rojos maduros en silvestres y mutantes *Slgpp1* (GGP-5261 y GGP-49C12) en tratamientos control, 0,5 mM ACC y control, 8ppm 1MCP.

Letras minúsculas denotan diferencias estadísticas entre genotipos para el mismo tratamiento y las letras mayúsculas denotan diferencias estadísticas entre el mismo genotipo para diferentes tratamientos (ANOVA, $P \leq 0.05$). Los valores son la media de tres experimentos independientes.

Efectos del ACC y 1-MCP en el contenido de antioxidantes durante la maduración de frutos deficientes de ácido ascórbico

El contenido de ácido ascórbico total en frutos mutantes *Slgpp1* es entre 30 % y 60% respecto del contenido de frutos silvestres (Fig. 20a, c), mientras que la aplicación de ACC disminuye el contenido de ácido ascórbico total sólo en los estadios OR y RR de frutos silvestres (Fig. 20b); mientras que, el 1-MCP disminuye significativamente el contenido de ácido ascórbico de frutos mutantes *Slgpp1* durante la maduración (Fig. 20d). El estado de oxidación de ácido ascórbico (DHA), aumenta con el tratamiento de ACC en frutos mutantes *Slgpp1* en el estadio BR (Fig. 20b), mientras que el 1-MCP aumenta el estado de oxidación del ácido ascórbico en los estadios MG y BR de los tres genotipos analizados (Fig. 20d).

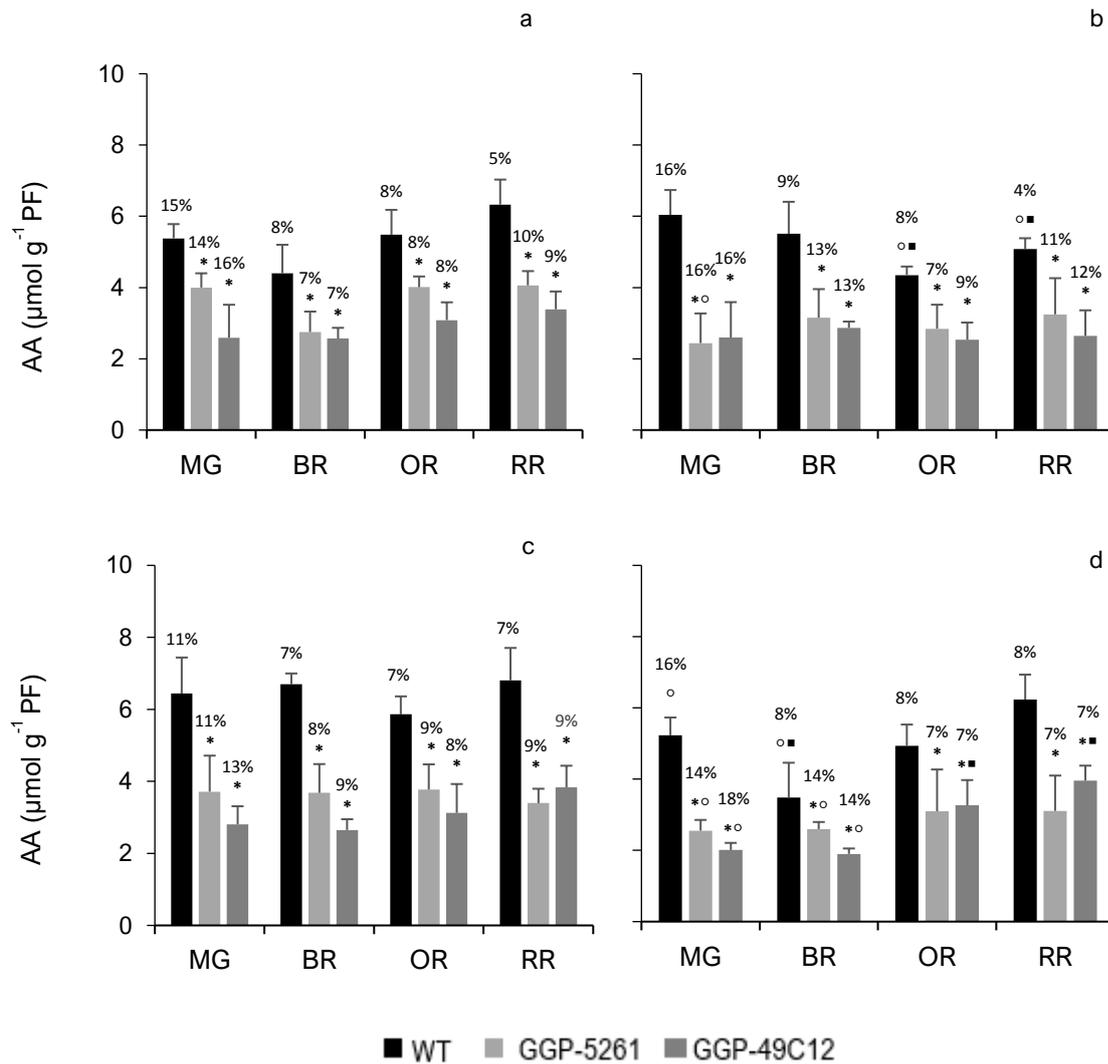


Figura 20. Contenido de ácido ascórbico total y porcentaje de DHA (%) en frutos de tratamientos control ACC (a), tratados con 0,5 mM ACC (b) y control 1-MCP (c) y tratados con 8 ppm 1-MCP (d).

Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Los datos se expresan en base al peso fresco. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos para la misma etapa de maduración y tratamiento, (o) denota diferencias estadísticas entre el mismo genotipo y etapa de maduración para diferentes tratamientos y (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, $P \leq 0.05$).

El contenido de glutatión de frutos mutantes *Slgpp1* es 40% mayor que el contenido de frutos silvestres (Fig. 21a, c), mientras que el ACC disminuye significativamente el contenido de glutatión de mutantes *Slgpp1* durante la maduración (Fig. 21b), disminución que también se observa con los tratamientos de 1-MCP con excepción de frutos en estadios MG (Fig. 21b).

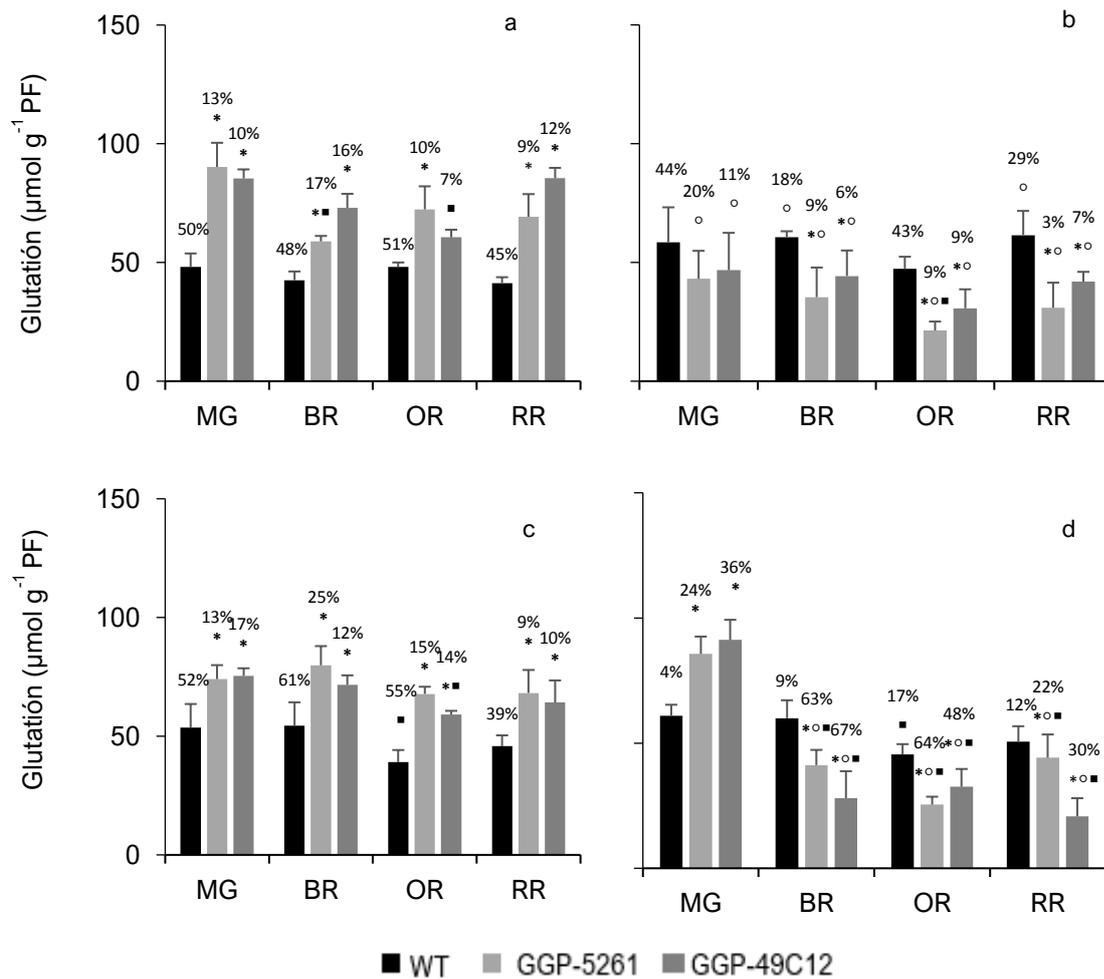


Figura 21. Contenido de glutatión total y porcentaje de glutatión oxidado (%) en frutos de tratamientos control ACC (a), y tratados con 0,5 mM ACC (b) y control 1-MCP (c) y tratados con 8 ppm 1-MCP (d). Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Los datos se expresan en base al peso fresco. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos para la misma etapa de maduración y tratamiento, (o) denota diferencias estadísticas entre el mismo genotipo y etapa de maduración para diferentes tratamientos y (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, P<0.05).

Efectos del ACC y 1-MCP en la producción de ROS (H₂O₂) y daño a lípidos durante la maduración de frutos deficientes de ácido ascórbico

La producción de H₂O₂ tiene un pico en los estadios BR y OR de frutos silvestres, mientras que no se observaron diferencias en el contenido de H₂O₂ de frutos mutantes *Slgpp1* durante la maduración en los tratamientos control (Fig. 22a, c). El tratamiento con ACC incrementó significativamente la producción de H₂O₂ en los estadios MG y BR en frutos de los dos mutantes *Slgpp1* (Fig. 22b), mientras que el tratamiento con 1-MCP disminuyó el contenido de H₂O₂ durante la maduración de los tres genotipos analizados (Fig. 22d).

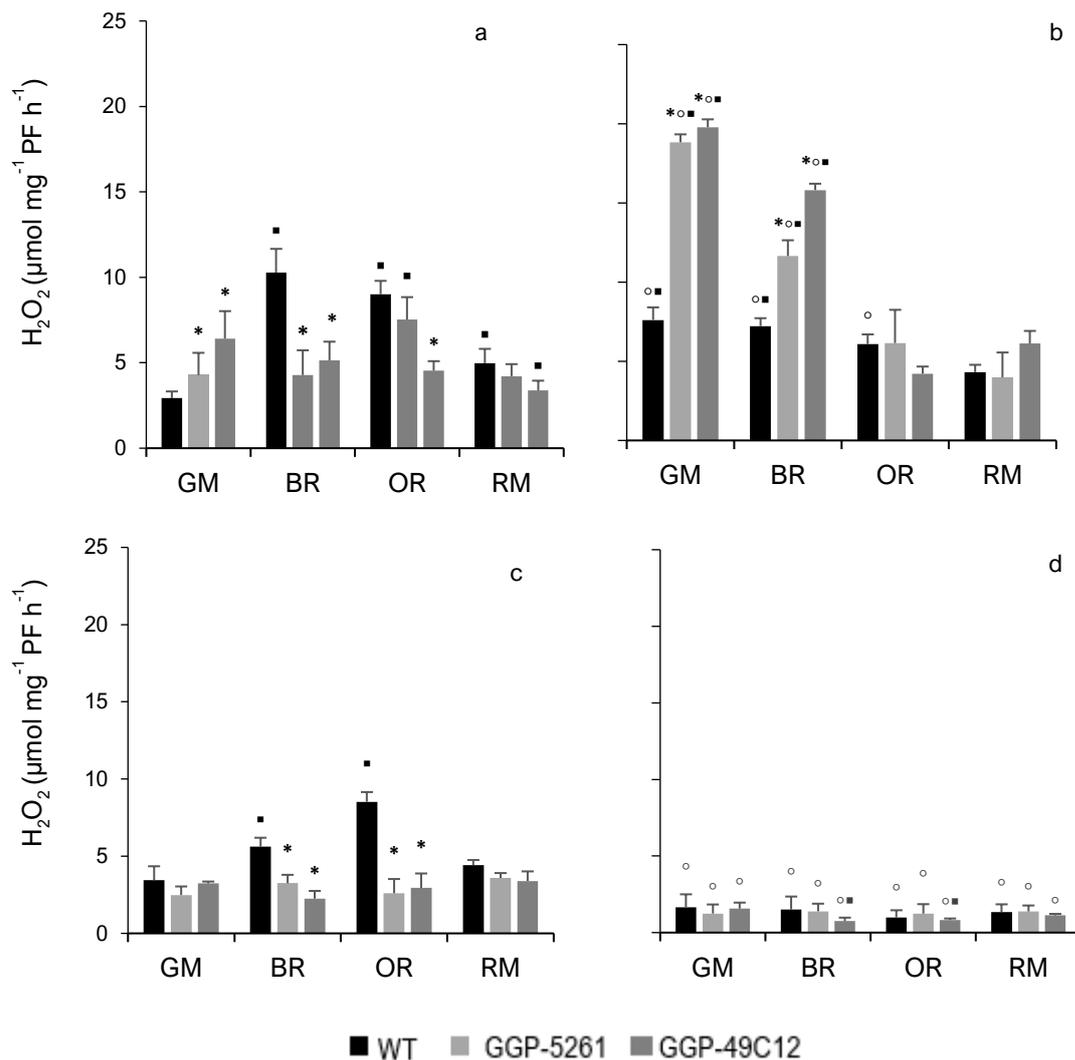


Figura 22. Contenido de H₂O₂ en frutos de tratamientos control ACC (a), 0,5 mM ACC (b) y control 1-MCP (c) y 8 ppm 1-MCP (d).

Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Los datos se expresan en base al peso fresco. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos para la misma etapa de maduración y tratamiento, (o) denota diferencias estadísticas entre el mismo genotipo y etapa de maduración para diferentes tratamientos y (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, P≤0.05).

El estado de peroxidación lipídica, medida como contenido de MDA, aumenta con la maduración en los frutos silvestres y mutantes *Slgpp1* (Fig. 23a, c), mientras que el ACC no afecta el contenido de MDA durante la maduración en los tres genotipos analizados (Fig. 23b), y el 1-MCP disminuye el contenido de MDA de frutos silvestres durante la maduración (Fig. 23d).

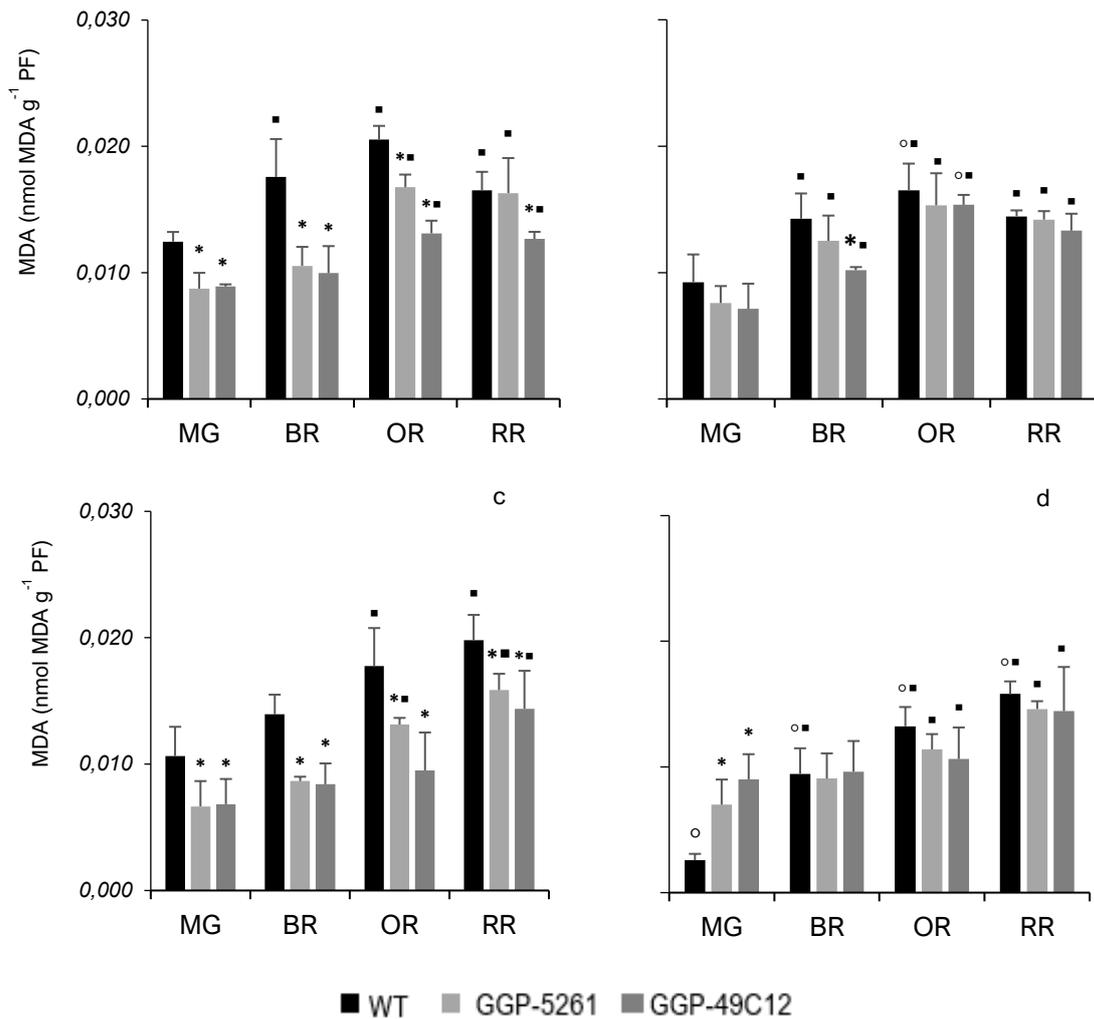


Figura 23. Peroxidación lipídica medida como contenido de MDA en frutos de tratamientos control ACC (a) 0,5 mM ACC (b) y control 1-MCP (c) y 8 ppm 1-MCP (d).

Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Los datos se expresan en base al peso fresco. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos para la misma etapa de maduración y tratamiento, (o) denota diferencias estadísticas entre el mismo genotipo y etapa de maduración para diferentes tratamientos y (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, $P \leq 0.05$).

Discusión

El aumento en la tasa respiratoria y la síntesis de etileno son eventos importantes para iniciar el proceso de maduración en frutos climatéricos como el tomate (Lelievre y col., 1997). Se han descrito dos sistemas reguladores que coordinan la biosíntesis de etileno. En las plantas, el Sistema 1 produce bajas cantidades de etileno en todos los tejidos, incluyendo frutos climatéricos y no climatéricos, y tiene un control autoinhibitorio sobre la síntesis de esta hormona, mientras que el Sistema 2 tiene un control autocatalítico que produce un pico masivo de etileno en frutos climatéricos, que está ausente en frutos no climatéricos (Bouzayen y col., 2009). A nivel molecular, la diferencia entre estas dos fisiologías de la maduración en frutos,

climatéricos o no climatéricos, es debido a la inducción de la transcripción de la ACC sintasa, que está limitada en el Sistema 1 y estimulada en el Sistema 2. Esa es la razón por la que los frutos climatéricos inmaduros responden al nivel de recepción de etileno exógeno, pero no inician el proceso de maduración, mientras que en frutos climatéricos verdes maduros se produce una inducción de genes asociados al etileno que desencadena la cadena de respuestas (Yang, 1987). Tratamientos exógenos de etileno o sus precursores como el ACC para inducir la maduración de frutos, y tratamientos exógenos como los inhibidores de su respuesta, como es el caso del 1-MCP, son altamente usados como herramientas en la tecnología de postcosecha. En particular, Yokotani y col. (2009), confirmaron a través del uso del 1-MCP la hipótesis sobre la inhibición de la señalización del etileno a esta molécula, y por lo tanto la función del etileno durante la maduración del tomate.

Para probar la vinculación del metabolismo oxidativo con la maduración modulada por el etileno, frutos silvestres y mutantes *Slggp1* fueron tratados con ACC o 1-MCP durante el proceso de maduración. El tratamiento con ACC adelantó la maduración de los tres genotipos analizados, sin embargo, no reestablece el tiempo de maduración de los frutos mutantes *Slggp1* al tiempo observado en frutos silvestres, mientras que el tratamiento de 1-MCP retrasó de igual manera el tiempo de maduración de los frutos de los tres genotipos analizados. Estos resultados se encuentran en concordancia con lo ampliamente establecido para sustancias precursoras del etileno como el ACC e inhibidoras de su acción como el 1-MCP, modulando la maduración del tomate (Nasuka y col., 1998; Zhang y col., 2009; Liu y col., 2021). Sin embargo, los resultados observados estarían indicando que la inhibición de los receptores de etileno es más efectiva en la modulación del tiempo maduración en frutos deficientes de ácido ascórbico, retrasándola, aspecto que será abordado en el siguiente capítulo.

Se ha observado que tratamientos con ácido ascórbico estimulan la producción de etileno a través de la activación del gen de la ACC oxidasa en raíces de maíz (Kim y col., 2014), además de aumentar su concentración y adelantar la maduración en frutos mutantes *Slggp1* (Capítulo II del presente trabajo). Por el contrario, en el presente trabajo los resultados indican que el tratamiento con etileno no afecta significativamente el contenido de ácido ascórbico, pero reducir la sensibilidad al etileno a través del bloqueo de los receptores, sí afecta el contenido de ácido ascórbico, aspecto que será analizado en el siguiente capítulo.

Por otro lado, a pesar de la acción conjunta del ácido ascórbico y el glutatión en el metabolismo antioxidante y el mayor contenido de glutatión observado en mutantes *Slggp1* (Capítulos I y II del presente trabajo), a diferencia de lo observado con el contenido de ácido ascórbico, los

tratamientos de ACC y 1-MCP disminuyen el contenido de glutatión total en ambos mutantes *Slgpp1*. Diferentes estudios han sugerido que modificaciones en la síntesis y sensibilidad del etileno afectan la expresión de enzimas de la síntesis de glutatión y el contenido de glutatión total, afectando su capacidad antioxidante (Yoshida y col., 2009; Ghanta y col 2014), sin embargo, además de su importante función como antioxidante, el glutatión también es crítico en la regulación de diferentes procesos celulares que incluyen la expresión génica, la síntesis de proteínas y ADN, la proliferación celular y la apoptosis, la transducción de señales, la producción de citoquinas, la respuesta inmunitaria y la glutatiónilación de proteínas (Gong y col, 2018), por lo que afectar su síntesis podría generar efectos durante la maduración de frutos mutantes *Slgpp1* que no estarían relacionados a la deficiencia de ácido ascórbico generada por la mutación en GGP1.

La interacción entre hormonas y ROS se ha establecido en varios procesos durante el desarrollo de las plantas (Bartoli y col., 2013), pero esta relación y su relevancia han sido escasamente reportadas para la maduración de frutos. Se ha demostrado que tratamientos que aumentan la producción de H₂O₂ van acompañados de un aumento del etileno y que tratamientos con etileno estimulan la producción de H₂O₂ en peras (Brennan y Frenkel 1977), mientras que tratamientos con etileno o su inhibidor de la acción, el 1-MCP, aumentan o disminuyen la concentración de H₂O₂, respectivamente, en frutos de mango (Wang y col, 2009). En el presente trabajo, el tratamiento con ACC produce un gran aumento de la producción de H₂O₂ en los estadios de MG y BR mientras que el 1-MCP los reduce drásticamente. Estos resultados sugieren que el etileno y el H₂O₂ están involucrados en los procesos que desencadenan la maduración del fruto, sin embargo, no se conoce cómo el etileno regula la producción de H₂O₂, ni tampoco los procesos a nivel molecular involucrados, aspectos que serán analizados en el siguiente capítulo.

Se ha observado un aumento del daño oxidativo durante la maduración de frutos como el tomate o el duraznero (Jimenez y col, 2002; Qing y col, 2009), y carbonilación de proteínas mitocondriales en los tejidos del fruto durante la senescencia (Tian y col., 2013). Los resultados presentados en este trabajo muestran que la alteración de la síntesis de H₂O₂ inducida por tratamientos con ACC o 1-MCP no produce un cambio significativo en el patrón de daño oxidativo en frutos de tomate, por lo que la producción de H₂O₂ observada en los primeros estadios de la maduración del tomate no estarían relacionados a un daño oxidativo, sino más bien a su posible participación dentro de los procesos metabólicos relacionados a la maduración del fruto.

Tomados como un todo, el efecto en la concentración de glutatión luego de la aplicación de ACC sin cambios en el ácido ascórbico y la disminución en la concentración de ambos antioxidantes luego de la aplicación de 1-MCP, indican que el efecto del etileno en el estado estacionario del H_2O_2 , está asociado con un aumento de su síntesis y no con una disminución de la capacidad depuradora de ROS debido a la deficiencia de ácido ascórbico. Estos resultados sugieren además que el H_2O_2 es un actor natural en la maduración del fruto y que otros componentes del metabolismo oxidativo (es decir, ascorbato o glutatión) pueden no estar directamente involucrados.

CAPITULO IV. EFECTO DEL ESTRÉS INDUCIDO POR ALTAS IRRADIANCIAS EN LA MADURACIÓN DE FRUTOS DE PLANTAS DE TOMATE MUTANTES DEFICIENTES EN GDP-L-GALACTOSA FOSFORILASA CON BAJO CONTENIDO DE AA.

Antecedentes específicos

En la gran mayoría de las especies vegetales, las hojas son consideradas como los órganos autotróficos por antonomasia, mientras que los frutos y las raíces son básicamente heterotróficos que dependen del suministro de las hojas para crecer y desarrollarse hasta su tamaño final y composición. De manera similar a las hojas, se sabe que la formación de cloroplastos en el fruto, la síntesis de clorofila y el montaje del aparato fotosintético requieren exposición a la luz y la activación de una serie de señales de desarrollo. Además, las proteínas del cloroplasto implicadas en los complejos de recolección de luz, transferencia de electrones y fijación de CO₂ se expresan también en las células de los frutos y están reguladas por factores de transcripción de manera similar a la de las hojas (Hetherington y col., 1998; Carrara y col., 2001). Durante la maduración de frutos, se ha demostrado que la luz afecta la acumulación de carotenoides en varias especies, incluido el tomate. Alba y col. (2000) mostraron que la transducción de señales de luz mediada por fitocromos era necesaria para la pigmentación normal del fruto maduro, pero no afectó a otros atributos de la maduración. Mutantes de tomate con alto contenido de pigmentos (*hp1* y *hp2*), caracterizados por un aumento de la clorofila en frutos verdes y hojas, además con mayor contenido de carotenoides totales en el fruto maduro, resultaron ser hipersensibles a la luz (Peters y col., 1989).

El daño al aparato fotosintético de las hojas inducido por la exposición a alta irradiancia se conoce desde hace mucho tiempo, siendo la fotoinhibición de la fotosíntesis y la fotorrespiración algunos de los mecanismos presente ante condiciones ambientales desfavorables (Kyle y col. 1987). La fotoinhibición de la fotosíntesis afecta tanto al fotosistema II (PSII), como al fotosistema I (PSI). En un principio el término fotoinhibición se utilizó como un sinónimo de fotoinhibición del PSII, dado que el daño a la proteína D1 del PSII había sido considerada el objetivo principal, además de que el PSI es más estable que el PSII bajo condiciones de exceso de irradiancia (Aro y col., 1993, Powels, 1984). A pesar de la respuesta diferencial de los fotosistemas I y II a tratamientos con H₂O₂ en condiciones de oscuridad (Casierra-Posada, 2007), el efecto del oxígeno singlete y del anión superóxido en la fotoinhibición por altas irradiancias sugieren que en este proceso las ROS están involucrados (Barber y Andersson, 1992; Hideg y Wass, 1995). Por otro lado, se reconoce que el H₂O₂ se reduce a agua mediante la acción de la enzima APX, la cual está unida a los tilacoides del estroma, cerca del PSI. Por tanto, posiblemente las enzimas reductoras de oxígeno de los cloroplastos podrían servir para proteger el PSI *in vivo* (Miyake y Asada, 1992).

Otros mecanismos se han propuesto para la protección de los fotosistemas, particularmente aquellos que dependen del ácido ascórbico para la disipación del exceso de energía lumínica o

la disipación de la formación de especies nocivas como las ROS. La disipación térmica del exceso de energía medida como “*quenching*” no fotoquímico (NPQ) se reconoce como de suma importancia en la protección del aparato fotosintético contra los efectos nocivos de exceso de luz. Gracias a los procesos de NPQ, una fracción importante del exceso de energía causado por un estrés lumínico es capturado (del inglés “*quenched*”) y convertido en calor (Baker, 2008). Los mecanismos moleculares del NPQ no están del todo dilucidados y se sugiere que hay varios procesos de “*quenching*”. El ácido ascórbico junto con el glutatión participa en la eliminación de ROS y disipación del exceso de energía causado por altas irradiancias en el denominado ciclo agua-agua (Asada 1999). Este ciclo incluye a la denominada “Reacción de Mehler” (Mehler, 1951), que comienza con la fotólisis del agua en el PSII, la fotorreducción del oxígeno para producir superóxido en el PSI y su dismutación hasta peróxido de hidrógeno por la actividad de la enzima SOD, esta última unida a tilacoides (Asada, 1999, 2006). El ciclo agua-agua continúa con la reducción del H₂O₂ hasta agua por la acción de la enzima APX. Esta reacción puede ocurrir tanto en el tilacoide como en el estroma, porque el H₂O₂ puede difundir al estroma del cloroplasto. En esta reacción, la APX cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno utilizando al AA como donador de electrones para reducir el H₂O₂ hasta agua generando radicales monodeshidroascorbato (MDHA). Esta ruta funciona no sólo para disminuir la reducción del PSI, sino que también genera un gradiente de pH que regula el flujo de electrones del PSII al PSI (Asada, 1994; 1999).

Por otro lado, la producción de ROS inducida por estrés podría promover rápidamente la producción de etileno (Alonso, JM y Stepanova AN, 2004; Guo H y Ecker JR, 2004). Mutantes *eto1* y *eto3* que producen más etileno muestran ser más sensibles al estrés por ROS y exhiben una mayor propagación de muerte celular inducida por ROS (Rao y col., 2002), mientras que los mutantes *etr1* y *ein3*, insensibles al etileno, son altamente tolerantes al estrés por ROS; estos hechos indican que el etileno es un regulador positivo de la producción de ROS y la propagación de la muerte celular inducida por ROS (Overmyer y col., 2003; Mersmann y col., 2010; Peng y col., 2014). Por otro lado, se ha identificado que la producción de ROS inducida por etileno en las plantas es mediada por las NADPH oxidasas (Desikan y col., 2006; Wi, y col., 2012). Diferentes estudios han mostrado una regulación recíproca entre la producción de etileno y ROS. Se ha descubierto que varios componentes de la vía de señalización del etileno están implicados en las respuestas a ROS. El receptor de etileno ETR1 es un componente crítico en la intercomunicación entre el etileno y la señalización por ROS en las células del estomas (Desikan y col., 2006), además que la mutación en el receptor de etileno ETR1 y en el factor de transcripción EIN3 podría aumentar la tolerancia a ROS (Overmyer y col., 2003; Desikan y col., 2006; Poor y

col., 2015). Además, estudios recientes también mostraron que los ERF están relacionados con la producción de ROS, por ejemplo, se informó que AtERF15 y AtERF71 (*Arabidopsis*), CaPF1 (pimienta) y JERF3 (tabaco), están relacionados con las respuestas de estrés biótico y / o abiótico de las plantas, e involucrados en la regulación de la producción o acumulación de ROS (Park y col., 2011; Zhang y col., 2015; Tang y col., 2005; Wu y col., 2008).

Se ha postulado que, durante la maduración de frutos de tomate, la transición de cloroplastos a cromoplastos involucra un daño celular por aumentos en los niveles estacionarios de ROS (Cocaliadis y col., 2014). En el presente trabajo se analiza la hipótesis de que el bajo contenido de ácido ascórbico afecta la generación de ROS por altas irradiancias y por tanto el cambio de color durante la maduración. Con ese objetivo, utilizamos dos líneas de mutantes de tomate deficientes en GGP con bajo contenido de ascórbico en hojas y frutos (30% del silvestre) (Baldet y col., 2013, Alegre y col., 2020), expuestas a alta irradiancia durante la maduración de los frutos.

En este capítulo se abordó el objetivo específico 4 que consistió en determinar el efecto del estrés inducido por altas irradiancias en la maduración de frutos de plantas mutantes deficientes en GDP-L-galactosa fosforilasa con bajo contenido de AA.

En función de éste, se fijaron seis actividades a realizar:

1. Exponer frutos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres crecidos en irradiancias de invernáculo (GI) a altas irradiancias (HI), fuera del invernáculo.
2. Evaluar los parámetros fotosintéticos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres.
3. Determinar el tiempo de maduración de frutos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres.
4. Evaluar la respuesta del metabolismo antioxidante de frutos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres.
5. Determinar la generación de H₂O₂ y el daño a lípidos de frutos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres.
6. Evaluar la expresión de genes relacionados con el proceso de maduración de frutos de plantas mutantes para GGP1 (GGP-5261 Y GGP-49C12) y silvestres.

Resultados

Temperatura de frutos con bajo contenido de ácido ascórbico expuestos a alta irradiancia La temperatura fuera del invernáculo aumentó aproximadamente 10 °C. El tratamiento por alta irradiancia provocó un aumento de la temperatura en los frutos de los tres genotipos analizados. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la temperatura de frutos silvestres y mutantes *Slgpp1* (Tabla 5). Por otro lado, se observa que la temperatura de los frutos siempre es menor a la temperatura atmosférica, tanto dentro como fuera del invernáculo (2 °C y 4 °C, respectivamente). No se observaron diferencias significativas en la temperatura de frutos silvestres y mutantes *Slgpp1* durante la maduración (Fig. 24).

		GI	HI
Atmosfera		28,6 ± 0,9 aA	40,1 ± 1,5 bB
	WT	27,9 ± 1,4 aA	38,5 ± 2,3 aB
Frutos	GGP-5261	27,6 ± 1,1 aA	37,2 ± 0,7 aB
	GGP-49C12	27,3 ± 2,1 aA	37,9 ± 2,8 aB

Tabla 5. Temperatura (°C) atmosférica de los frutos (promedio de frutos de los 4 estadios de maduración analizados), en tratamientos GI y HI.

Letras minúsculas denotan diferencias estadísticas entre genotipos para el mismo tratamiento y las letras mayúsculas denotan diferencias estadísticas entre el mismo genotipo para diferentes tratamientos (ANOVA, $P \leq 0.05$). Los valores son la media de tres experimentos independientes.

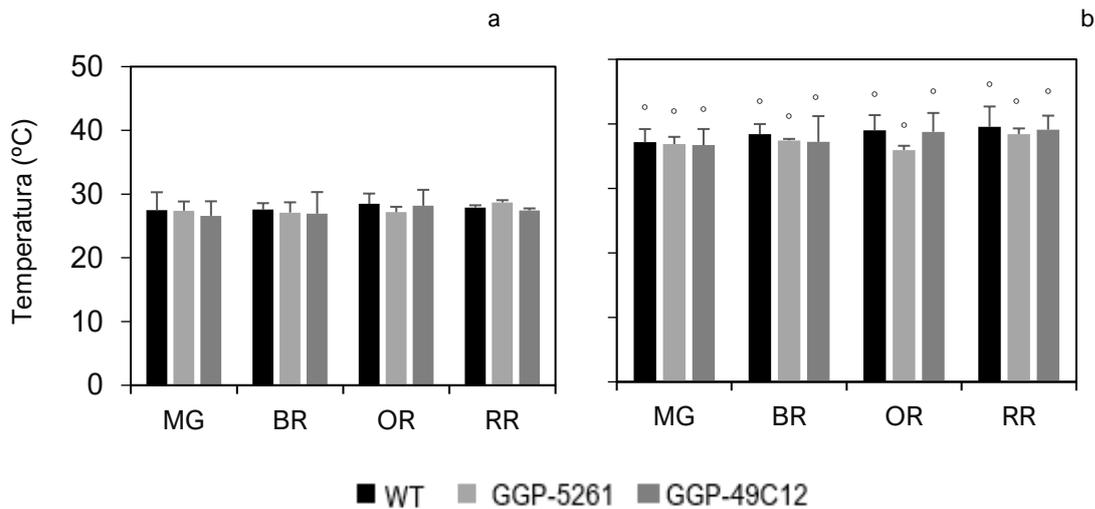


Figura 24. Temperatura de frutos expuesto a GI (a) y expuestos HI (b).

Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos para la misma etapa de maduración y tratamiento, (o) denota diferencias estadísticas entre el mismo genotipo y etapa de maduración para diferentes tratamientos y (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, $P \leq 0.05$).

Efecto de la alta irradiancia y temperatura en la fotosíntesis de frutos con bajo contenido de ácido ascórbico

Dado que anteriormente observamos que durante la maduración del fruto los cloroplastos eran una fuente importante de producción de ROS, se midió la fotosíntesis en frutos donde aún se aprecia fluorescencia de la clorofila: estadios MG y BR (Cap. II, Fig. 15). Se observó que la tasa de transporte de electrones (ETR) de frutos crecidos dentro del invernáculo (GI), fue similar en el estadio MG en los tres genotipos analizados, pero disminuyó ligeramente en ambos mutantes *Slgpp1* en el estadio BR, mientras que en la condición de alta irradiancia (HI), la ETR de los frutos aumentó por un factor de 7 a 10 en los dos estadios, en los tres genotipos analizado (Tabla 6). La eficiencia máxima de PSII (F_v/F_m) de frutos crecidos dentro del invernáculo (GI), disminuyó ligeramente en ambos mutantes *Slgpp1* en el estadio BR, lo cual también fue observado en frutos BR mutantes *Slgpp1* expuestos a altas irradiancias (HI) (Tabla 6). El "quenching" no fotoquímico (NPQ) fue bajo en frutos crecidos dentro del invernáculo (GI), siendo significativamente menor en frutos del estadio BR de los dos mutantes *Slgpp1*, y alto en frutos expuestos a altas irradiancias (HI), en los dos estadios de maduración de los tres genotipos analizado (Tabla 6).

	ETR ($\mu\text{mol electrons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)				F_v / F_m				NPQ			
	GI		HI		GI		HI		GI		HI	
	MG	BR	MG	BR	MG	BR	MG	BR	MG	BR	MG	BR
WT	37,2 ± 2,2aA	37,4 ± 5,2bA	268,0 ± 10,8bB	224,4 ± 35,6aB	0,87 ± 0,01aA	0,85 ± 0,04bA	0,84 ± 0,03aA	0,83 ± 0,02bA	0,11 ± 0,04aA	0,15 ± 0,04bA	1,33 ± 0,05aB	2,21 ± 0,40aB
GGP-5261	41,5 ± 2,9aA	28,0 ± 3,5aA	227,2 ± 18,1aB	309,4 ± 30,3bB	0,86 ± 0,03aB	0,74 ± 0,00aA	0,80 ± 0,02aA	0,78 ± 0,01aB	0,12 ± 0,09aA	0,05 ± 0,04aA	2,01 ± 0,35bB	1,72 ± 0,30aB
GGP-49C12	39,8 ± 1,5aA	25,6 ± 4,7aA	245,6 ± 23,8aB	299,3 ± 27,6bB	0,87 ± 0,02aB	0,78 ± 0,01aA	0,79 ± 0,03aA	0,78 ± 0,02aA	0,14 ± 0,10aA	0,06 ± 0,04aA	1,97 ± 0,20bB	1,43 ± 0,23aB

Tabla 6. Tasa de transporte de electrones (ETR), eficiencia máxima del PSII (F_v / F_m) y “quenching” no fotoquímico (NPQ) en frutos de dos estadios de maduración (MG y BR), crecidos en GI y HI. Letras minúsculas denotan diferencias estadísticas entre genotipos para el mismo tratamiento y las letras mayúsculas denotan diferencias estadísticas entre el mismo genotipo para diferentes tratamientos (ANOVA, $P \leq 0.05$). Los valores son la media de tres experimentos independientes.

Efecto de la alta irradiancia y temperatura en el tiempo de maduración de frutos deficientes de ácido ascórbico

Frutos mutantes *Slgpp1* mostraron un retraso en el tiempo de maduración, ya que tardaron aproximadamente 3 días más que los frutos silvestres en alcanzar el estadio RR desde el estadio MG en condiciones de invernáculo (Tabla 7). Cuando fueron expuestos a altas irradiancias (HI), los tres genotipos analizados adelantan su tiempo de maduración, sin embargo, el retraso en el tiempo de maduración de mutantes *Slgpp1* con respecto a frutos silvestres se mantiene o es mayor (entre 3 y 6 días).

	GI	HI
WT	14,0 ± 0,5 aB	10,0 ± 1,0 aA
GGP-5261	16,0 ± 1,0 bA	13,0 ± 1,5 bA
GGP-49C12	18,0 ± 1,0 bB	16,0 ± 1,0 cA

Tabla 7. Número de días para observar 50% de frutos rojos maduros silvestres y mutantes *Slgpp1* en GI, y HI.

Letras minúsculas denotan diferencias estadísticas entre genotipos para el mismo tratamiento y las letras mayúsculas denotan diferencias estadísticas entre el mismo genotipo para diferentes tratamientos (ANOVA, $P \leq 0.05$). Los valores son la media de tres experimentos independientes.

Respuesta antioxidante de frutos con bajo contenido de ácido ascórbico expuestos a alta irradiancia y temperatura durante la maduración

El contenido de ácido ascórbico permanece constante durante la maduración de frutos silvestres y mutantes *Slgpp1*, mientras que los frutos mutantes *Slgpp1* tienen una reducción del contenido de ácido ascórbico total de aproximadamente 50% en comparación con frutos silvestres. El estado de oxidación del ácido ascórbico disminuye en los estadios BR y OR de frutos silvestres y mutantes *Slgpp1* (Fig. 25a). La alta irradiancia provocó un aumento en el contenido de ácido ascórbico de frutos silvestres y del mutante GGP-49C12, mientras que no afectó la forma oxidada del ácido ascórbico de los tres genotipos analizados (Fig. 25b).

El contenido de glutatión total también permanece constante durante la maduración de frutos silvestres y mutantes *Slgpp1*, sin embargo, el contenido de glutatión total es mayor en frutos mutantes *Slgpp1* (aproximadamente 50%) (Fig. 25c). La alta irradiancia disminuyó significativamente el contenido de glutatión total en frutos silvestres y mutantes *Slgpp1* (Fig. 25d). El estado de oxidación del glutatión disminuyó en los estadios BR y OR de frutos silvestres y mutantes *Slgpp1* y es menor en frutos mutantes *Slgpp1* (aproximadamente 40%) en frutos dentro del invernáculo (Fig. 25c), mientras que las altas irradiancias provocaron un aumento en el estado de oxidación de glutatión en frutos mutantes *Slgpp1* en el estadio MG (Fig. 25d).

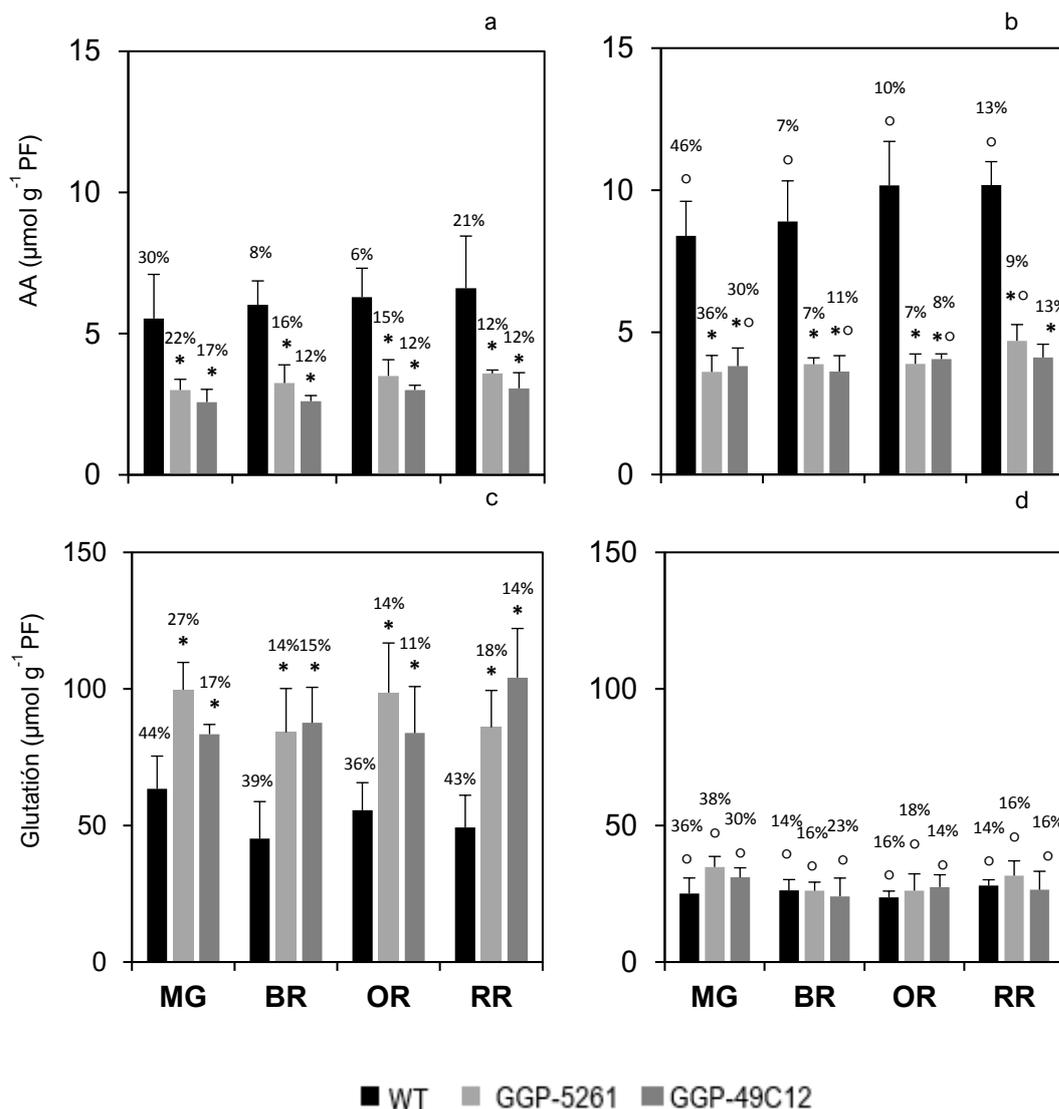


Figura 25. Contenido de ácido ascórbico total y porcentaje de oxidado (%) en frutos crecidos en GI (a) y HI (b). Contenido de glutatión total y porcentaje de glutatión oxidado (%) en frutos crecidos en GI (c) y HI (d).

Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos para la misma etapa de maduración y tratamiento, (o) denota diferencias estadísticas entre el mismo genotipo y etapa de maduración para diferentes tratamientos y (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, $P \leq 0.05$).

La actividad de CAT aumenta en los estadios BR y OR durante la maduración de frutos silvestres crecidos tanto dentro como fuera del invernáculo (Fig. 26a, b), mientras que no se observan diferencias significativas en la actividad de esta enzima en frutos mutantes *Slgpp1* crecidos adentro y afuera del invernáculo durante la maduración (Fig. 26a, b). La actividad de la enzima APX de frutos silvestres también aumenta en estadios BR y OR durante la maduración, mientras que no se observaron diferencias significativas durante la maduración de frutos mutantes *Slgpp1* (Fig. 26c). La alta irradiancia provocó el aumento en la actividad de CAT y APX de frutos silvestres

en estadio BR y OR, mientras que no se observaron diferencias significativas durante la maduración de frutos mutantes *Slgpp1* expuestos a alta irradiancia (Fig. 26d).

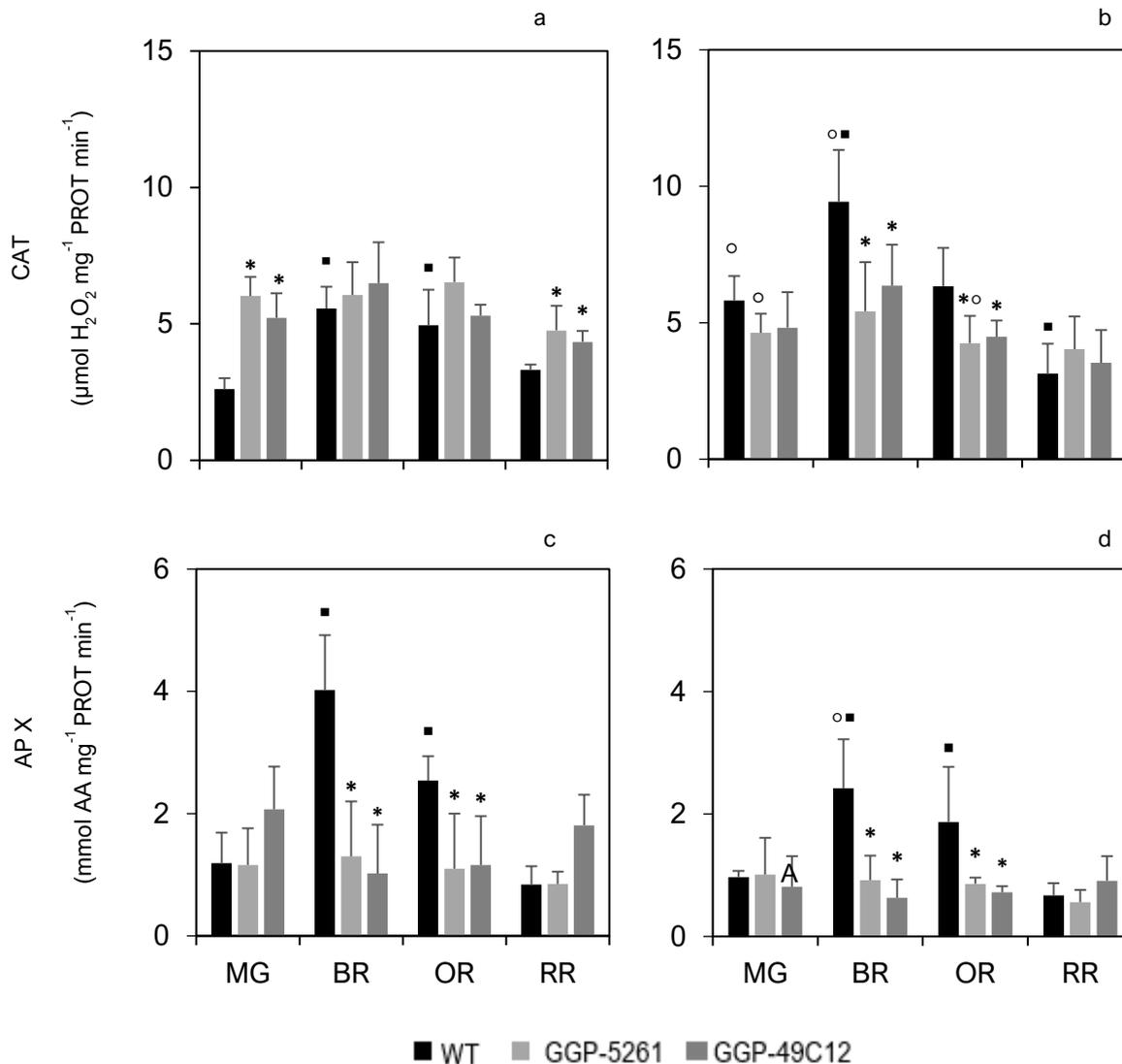


Figura 26. Cambios en la actividad de CAT, en frutos crecidos en GI (a) y HI (b). Cambios en la actividad de APX en frutos en GI (c) y HI (d).

Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos para la misma etapa de maduración y tratamiento, (o) denota diferencias estadísticas entre el mismo genotipo y etapa de maduración para diferentes tratamientos y (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, $P \leq 0.05$).

La producción de H_2O_2 aumentó en estadios BR y OR de frutos silvestres, mientras que no se observaron diferencias significativas durante la maduración en frutos mutantes *Slgpp1* (Fig. 27a). La alta irradiancia provocó un aumento en la producción de H_2O_2 de frutos en estadios MG, BR y RR en frutos silvestres y en el estadio BR de frutos mutantes *Slgpp1* (Fig. 27b). En cuanto a la peroxidación lipídica, no se observaron diferencias significativas en el contenido de MDA

durante la maduración de frutos silvestres y mutantes *Slgpp1*, sin embargo, el contenido de MDA en mutantes *Slgpp1* fue menor (aproximadamente 50%) (Fig. 27c). Por otro lado, las altas irradiancias provocaron un aumento significativo (mayor al 50%) del contenido de MDA en los tres genotipos analizados (Fig. 27d).

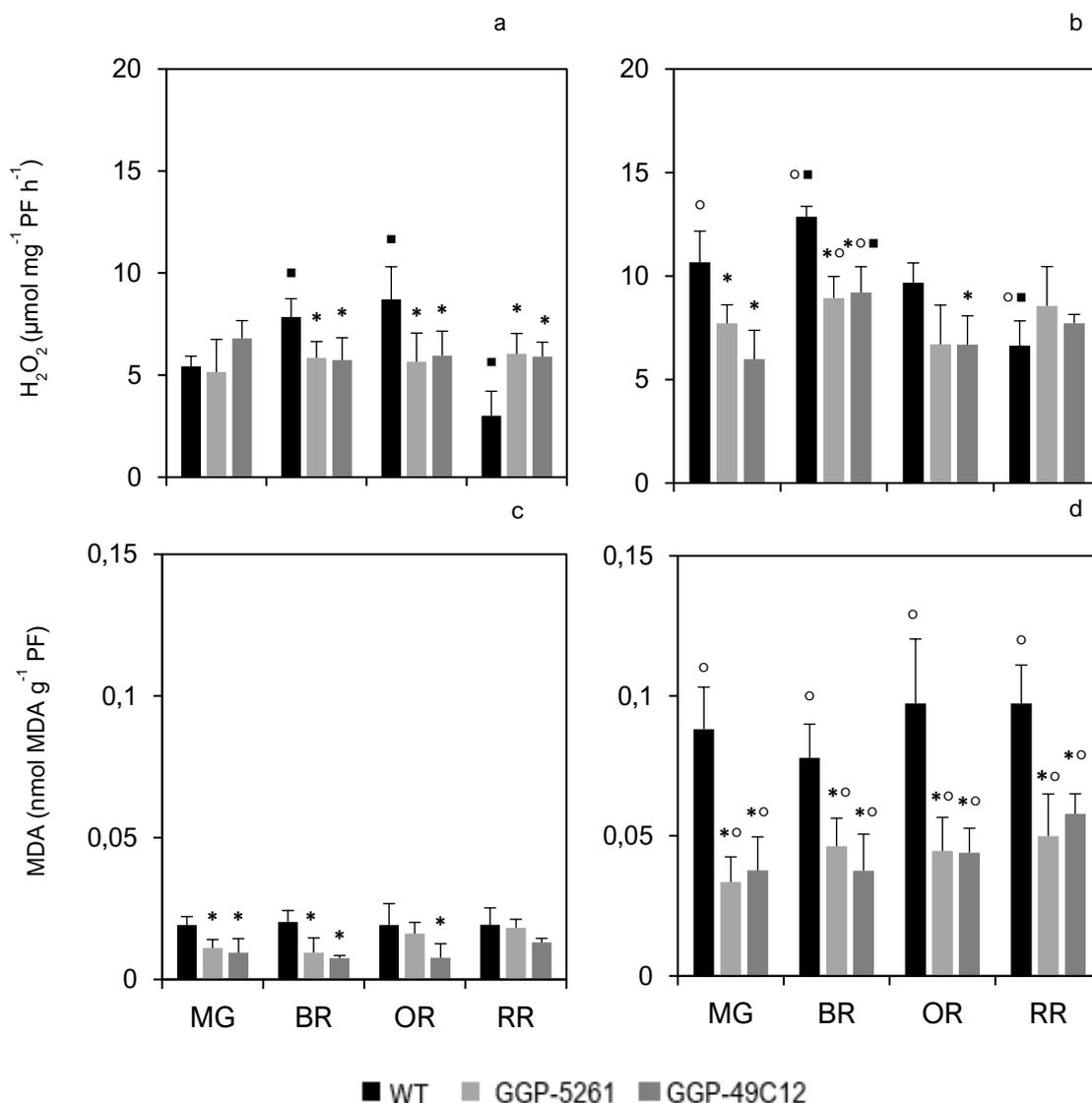


Figura 27. Producción de H₂O₂ en frutos crecidos en GI (a) y HI (b). Peroxidación en frutos crecidos en GI (c) y HI (d).

Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos en la misma etapa de maduración y tratamiento, (o) denota diferencias estadísticas entre el mismo genotipo y etapa de maduración para diferentes tratamientos y (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, P<0.05).

Expresión de genes asociados con estrés oxidativo y maduración de frutos deficientes en ácido ascórbico

Para investigar la asociación del estrés oxidativo con el inicio de la maduración del fruto, se seleccionaron genes específicos relacionados con la señalización de H₂O₂ y etileno y se analizó su expresión durante a maduración.

Entre los genes relacionados con el H₂O₂, se analizó la expresión de *JUBGBRUNNEN1 (JUB1)*, un factor de transcripción NAC inducido por H₂O₂ (Alshareef y col., 2019). La expresión aumentó gradualmente hasta el estadio OR antes de disminuir en RR (Fig. 28a, b), en los tres genotipos analizado durante la maduración. Sin embargo, la expresión es menor en frutos mutantes *Slgpp1* en los estadios BR y OR en frutos crecidos en condiciones de invernáculo, mientras que mostró una mayor inducción bajo condiciones de alta irradiancia frutos silvestres y ambos mutantes *Slgpp1* (Fig. 28b). También se analizó la expresión del gen *DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 1 (DREB1)*, otro gen relacionado con el H₂O₂, que pertenece a las familias de factores de transcripción (FT) de proteínas de unión a elementos sensibles al etileno (EREBP) y, por lo tanto, puede regular la expresión de muchos genes inducibles por estrés en las plantas (Zhang y col., 2009), cuya expresión se informó que estaba regulada por *JUB1*. La expresión de *DREB1* aumentó más tarde para alcanzar un máximo en el estadio RR en frutos silvestres, mientras que disminuyó drásticamente en los mutantes *Slgpp1* en el estadio RR (Fig. 28c). Este aumento de la expresión de *DREB1* es aún mayor bajo condiciones de alta irradiancia en frutos de estadio OR de los tres genotipos analizados (Fig. 28d).

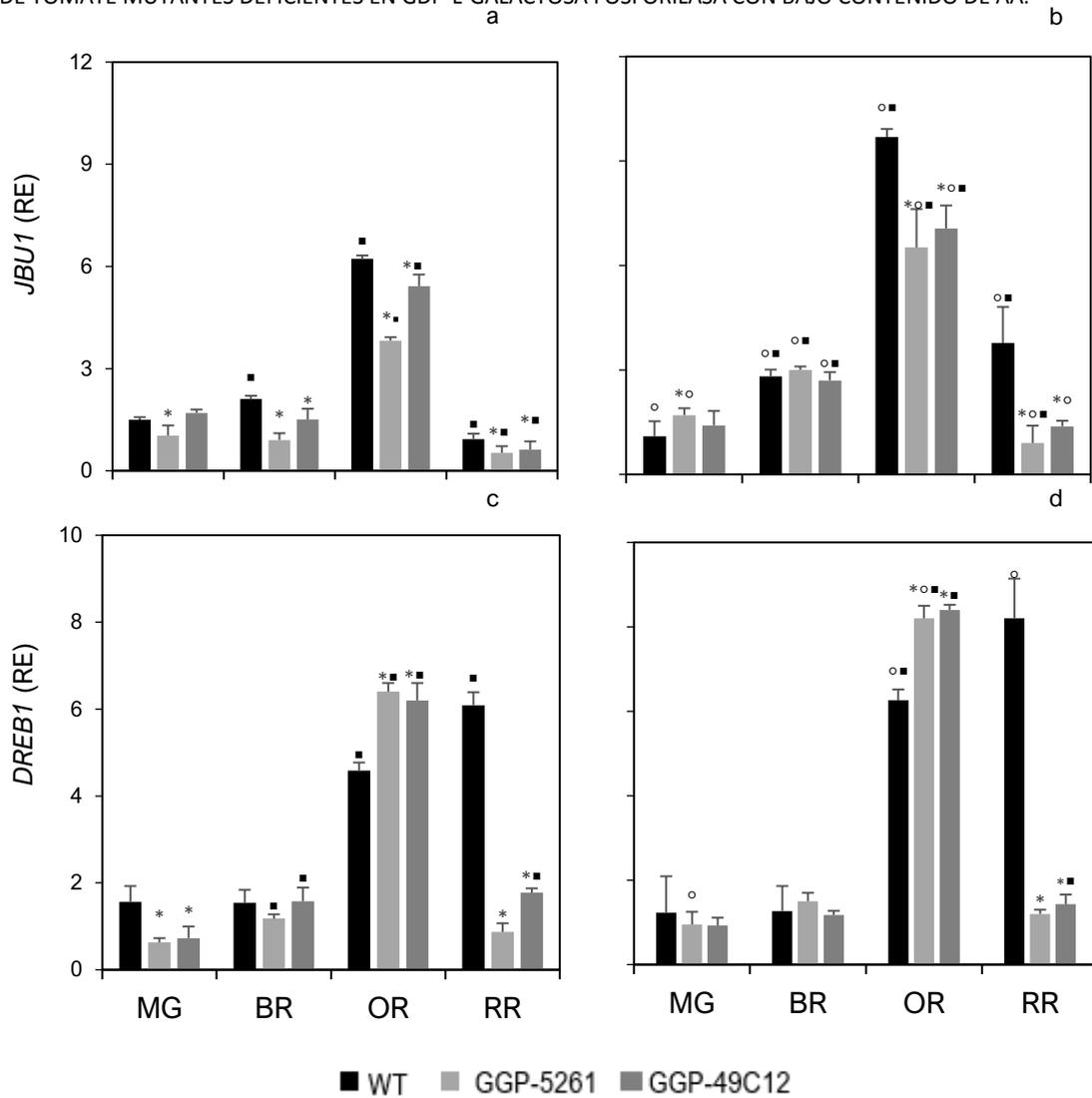


Figura 28. Expresión relativa (RE) de *JBU1* en frutos crecidos en GI (a) y HI (b) y de *DREB1* en frutos crecidos en GI (c) y HI (d), analizados por RT-PCR cuantitativa.

Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos en la misma etapa de maduración y tratamiento, (o) denota diferencias estadísticas entre el mismo genotipo y etapa de maduración para diferentes tratamientos y (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, $P \leq 0.05$).

Dado que la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de *DREB* (35S:DREB2A CA), resultó en la regulación positiva de un número importante de genes relacionados con respuestas al estrés abiótico y de choque térmico (Sakuma y col., 2006), que además se estableció que ciertas proteínas pequeñas de choque térmico (sHSP), como SIHSP17.6, SIHSP20.0 y SIHSP20.1, están reguladas transcripcionalmente por el etileno durante la transición del estadio MG a RR en la maduración del tomate (Shukla y col., 2017), se analizó la expresión de estas sHSP. De manera general, durante la maduración de frutos crecidos en condiciones de invernáculo, la expresión de las tres sHSP seleccionadas aumentó gradualmente hasta alcanzar un pico en el estadio OR para declinar en RR durante la maduración de frutos silvestres, mientras que en los mutantes *Slgpp1* su expresión siempre fue menor en comparación con frutos silvestres, con excepción de SIHSP20.1, es cual aumenta en el estadio RR para ambos mutantes *Slgpp1*, en comparación del estadio RR de los frutos silvestres (Fig. 29a, c, e). Por el contrario, la alta irradiación indujo un aumento mayor en la expresión de genes de estas enzimas en frutos *Slgpp1* que en frutos silvestres, lo que es particularmente evidente en estadios de transición durante la maduración (Fig. 29b, d, f).

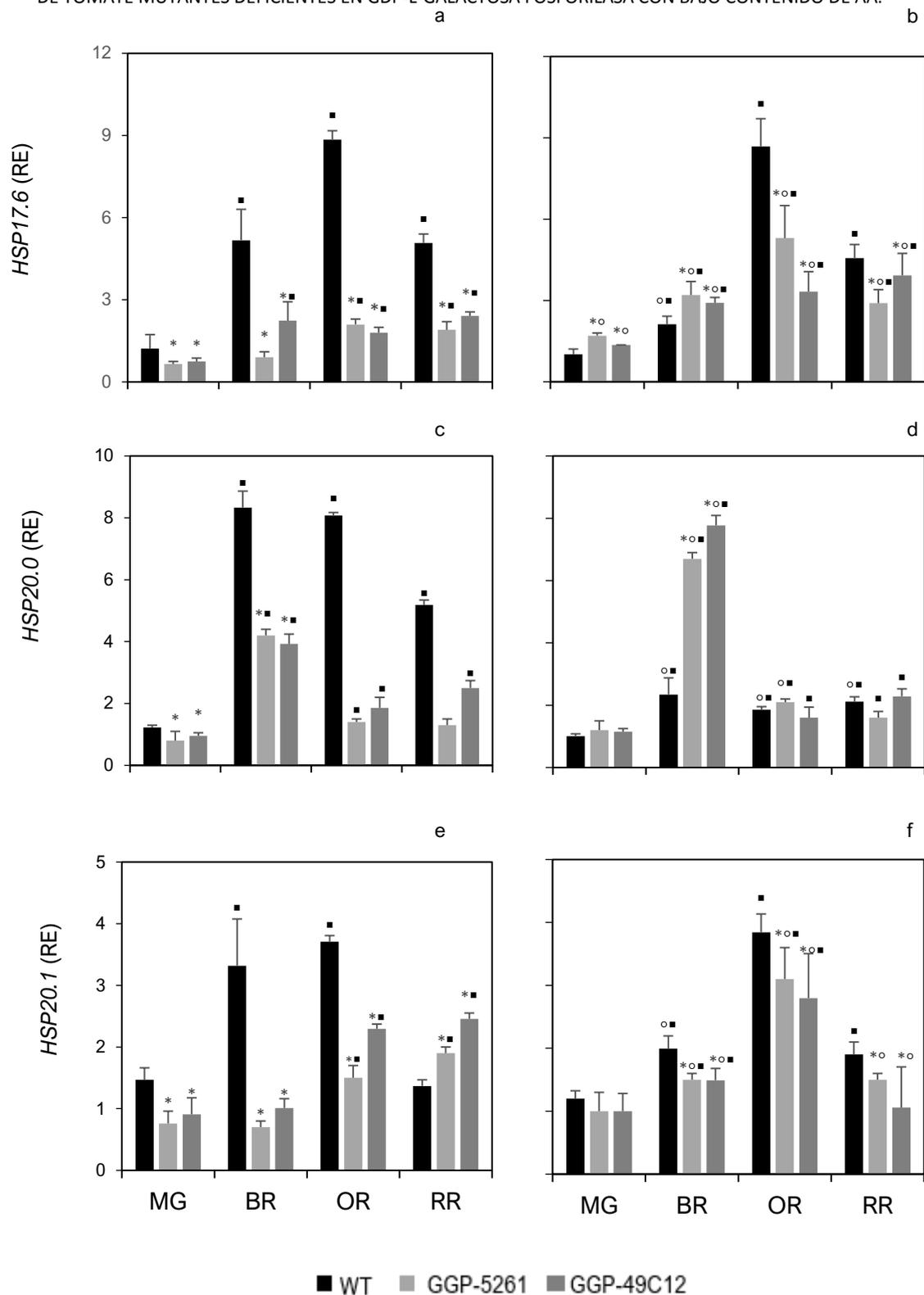


Figura 29. Expresión relativa (RE) de *HSP17.6* en frutos crecidos en GI (a) y HI (b), de *HSP20.0* en frutos crecidos en GI (c) y HI (d), y de *HSP20.1* en frutos crecidos en GI (e) y HI (f), analizados por RT-PCR cuantitativa.

Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos en la misma etapa de maduración y tratamiento, (o) denota diferencias estadísticas entre el mismo genotipo y etapa de maduración para diferentes tratamientos y (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, $P \leq 0.05$).

Considerando la regulación de la expresión de genes de sHSP por el etileno observada por Shukla y col. (2017), durante la maduración del tomate, se analizó la expresión de tres genes relacionados con la síntesis y sensibilidad al etileno, a saber, *1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 6(ACS6)*, *1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE OXIDASE 4 (ACO4)* y *NEVER-RIPE - ETHYLENE RECEPTOR 3 (ETR3)*.

El gen para la enzima ACC sintasa (*ACS6*), relacionada con la síntesis de etileno mostró la expresión más alta en el estadio MG y luego disminuyó durante la maduración de todos los genotipos analizados, con tendencia a ser menor en el estadio BR de frutos mutantes *Slgg1* tanto adentro como afuera del invernáculo (Fig. 30a, b). Sin embargo, se observa un aumento significativo de la expresión de este gen en frutos expuesto a alta irradiancia de los tres genotipos analizado (Fig. 30b).

La expresión del gen para la enzima ACC oxidasa (*ACO4*), también relacionada con la síntesis de etileno, se indujo en la etapa OR de los tres genotipos analizados, siendo mayor en frutos mutantes *Slggp1* que en frutos silvestres crecidos en el invernáculo (Fig. 30c), mientras que bajo alta irradiancia su expresión aumentó en estadios MG y BR, pero se redujo fuertemente en estadios más avanzados de frutos de los tres genotipos analizados (Fig. 30d).

En condiciones de invernáculo, la expresión del gen del receptor de etileno (*ETR3*), relacionado con la sensibilidad al etileno, mostró un pico en el estadio OR de frutos silvestres y los dos mutantes *Slggp1*, siendo aún mayor en frutos mutantes *Slggp1* (Fig. 30e), pero en condiciones de alta irradiancia este pico de expresión desapareció por completo (Fig. 30f).

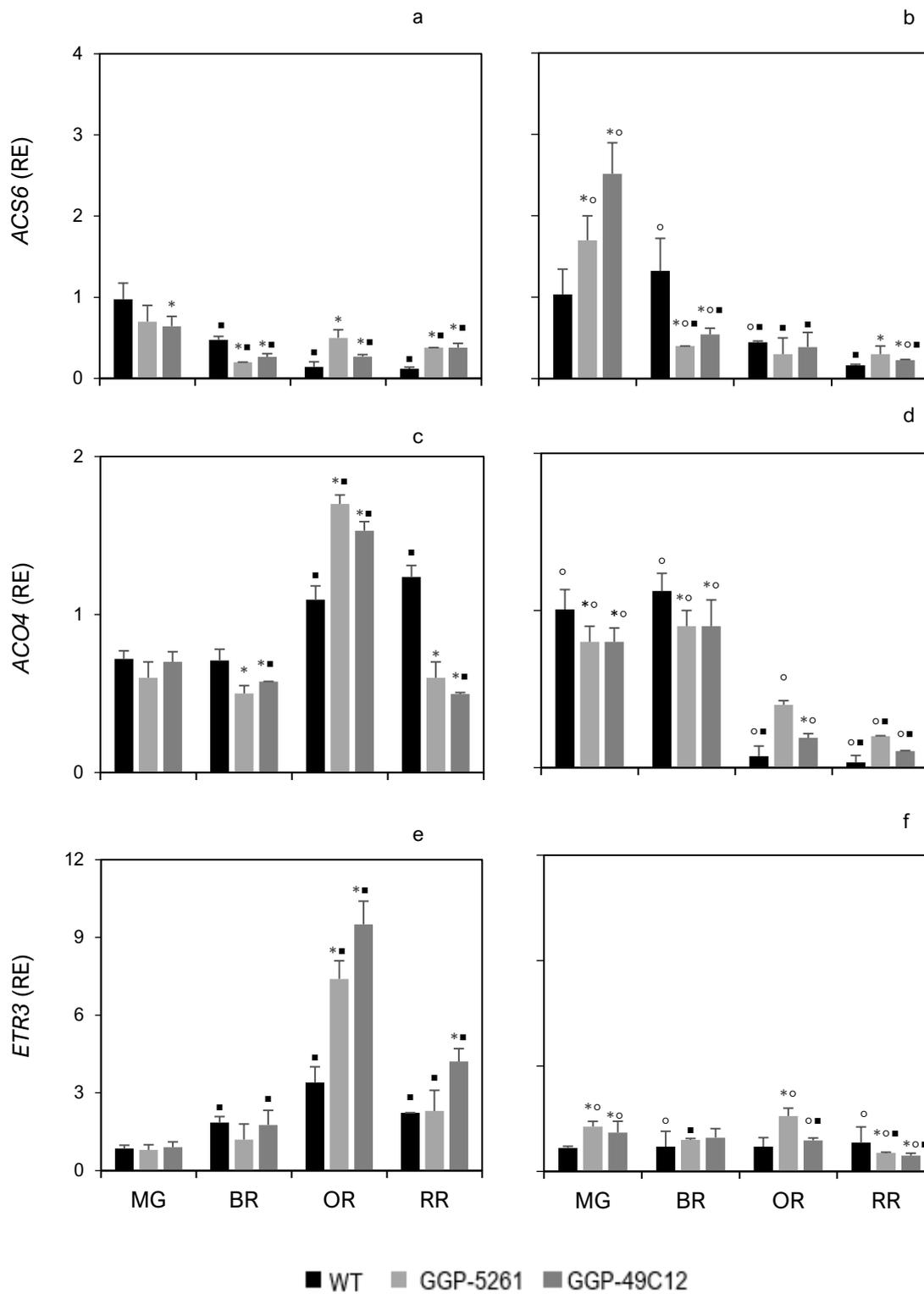


Figura 30. Expresión relativa (RE) de *ACS6* en frutos crecidos en GI (a) y HI (b), de *ACO4* en frutos crecidos en GI (c) y HI (d), y de *ETR3* en frutos crecidos en GI (e) y HI (f), analizados por RT-PCR cuantitativa.

Los valores son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. (*) denota diferencias estadísticas entre diferentes genotipos en la misma etapa de maduración y tratamiento, (o) denota diferencias estadísticas entre el mismo genotipo y etapa de maduración para diferentes tratamientos y (■) denota diferencias estadísticas en comparación con la etapa de MG para el mismo genotipo (ANOVA, $P \leq 0.05$).

Discusión

Dado que anteriormente se observó que los cloroplastos eran una de las principales fuentes de ROS en los frutos (Capítulo I del presente trabajo), plantas con frutos en estadio MG fueron sacadas del invernáculo para ser expuestas a alta irradiancia para estudiar la fotosíntesis del fruto en estadios MG y BR, los cuales aún presentan cloroplastos, y para estimular la síntesis de H₂O₂ derivada de la fotosíntesis. En general, durante la transición del estadio MG al BR los parámetros fotosintéticos (ETR y F_v/F_m), tienden a disminuir en frutos crecidos en el invernáculo o expuestos a alta irradiancia en los tres genotipos analizados. Por otro lado, mientras que la ETR de frutos mutantes *Slggp1* puede variar respecto a frutos silvestres, según el estadio de maduración analizado y la condición en la que crecieron (frutos estadio BR expuestos a HI presenta ETR mayores que los estadios MG), el F_v/F_m es generalmente menor en frutos mutantes *Slggp1*. Estos resultados están en concordancia con el dismantelamiento del aparato fotosintético reconocido durante el inicio de la transición de cloroplasto a cromoplasto (Egea y col, 2011). Sin embargo, el “*quenching*” no fotoquímico (NPQ), fue diferente durante la transición de frutos mutantes *Slggp1* con respecto al frutos silvestres, puesto que frutos deficientes de ácido ascórbico, sorpresivamente presentan menor NPQ que el observado en frutos silvestres durante la transición de MG a BR y cuando son expuestos a alta irradiancia. Aunque no está claro el aporte de asimilados provenientes de la fotosíntesis del fruto (Cocaliadis y col, 2014), por su condición de órgano destino, la mutación de GGP1 en frutos de tomate estaría afectando la capacidad fotosintética en el comienzo de la transición de cloroplasto a cromoplasto y la disipación térmica del exceso de energía medida como NPQ, lo cual estaría posiblemente relacionado con el contenido de clorofilas y carotenoides observado en frutos mutantes *Slggp1* (Capítulo I del presente trabajo).

El aumento en los parámetros fotosintéticos y el NPQ observado en el presente trabajo en frutos MG y BR de los genotipos silvestres y mutantes *Slggp1* muestran el efecto de la alta irradiancia y temperatura en la fotosíntesis del fruto. Además, este tratamiento redujo el tiempo de maduración y aumentó la producción de H₂O₂ en el estadio BR, sin inducir daño por alta irradiancia en todos los tres genotipos analizados, lo que demuestra aún más una asociación de los cambios de H₂O₂ con la maduración del fruto de tomate. Sin embargo, otros procesos celulares también pueden contribuir a la generación de H₂O₂ en condiciones de alta irradiancia como la fotorrespiración, la respiración o la actividad de la NADPH oxidasa. Además, aunque la exposición a alta irradiancia en el presente trabajo es usada para la inducción del metabolismo oxidativo, aumentar la fotosíntesis puede conducir a cambios en varios metabolitos (por

ejemplo, azúcares), que también pueden tener un impacto en el proceso de la maduración del fruto, que no estén relacionados a la deficiencia de ácido ascórbico.

Analizar la expresión de genes inducidos específicamente por el H₂O₂ podría aportar información que ayude a establecer su participación durante la maduración del fruto desencadenada por condiciones estresantes. El gen *JUB1* es un regulador negativo de la senescencia en hojas, y su expresión es inducida por tratamientos con H₂O₂ y por estrés abiótico (Wu y col., 2012). En frutos, este gen es inducido en el estadio BR sólo en frutos silvestres, pero bajo condiciones de estrés oxidativo (HI), se observa su expresión en los tres genotipos. Además, *JUB1* activa la expresión de factores de transcripción de los genes de la familia DREB que posiblemente estén implicados en el control de los niveles celulares de ROS al aumentar la actividad antioxidante (Wu y col., 2012; Thirumalaikumar y col., 2018). En este trabajo, *DREB1* también se expresa en gran medida en el estadio OR en condiciones de estrés en los tres genotipos analizados.

Las sHSP protegen a los cloroplastos y mitocondrias del estrés oxidativo en las células de las hojas y las raíces (Downs y col., 1999; Hamilton y col., 2001). En los frutos de tomate, estas proteínas se acumulan en la etapa BR y tienen un papel probado en la promoción de la síntesis de carotenoides (Neta-Sharir y col., 2005). En el presente trabajo se observó una mayor expresión de sHSP durante la transformación de cloroplasto a cromoplasto en los tres genotipos analizados. Estos resultados brindan otra evidencia de un vínculo del metabolismo oxidativo con un proceso fisiológico asociado específicamente con la maduración del fruto. Además, estas sHSP están reguladas negativamente por etileno (Shukla y col., 20117), lo cual está asociado con su menor expresión en mutantes *Slgpp1*, que tienen una mayor producción de esta hormona en etapas de transición de los frutos observadas previamente en condiciones de invernadero (Alegre y col., 2020).

El etileno constituye un elemento de señalización clave que controla la maduración del fruto de tomate (Alba y col., 2005; Giovannoni y col, 2017). La expresión de los genes *ACO4*, *ACS6* y *ETR3* observadas en el presente trabajo sugieren que la síntesis y la señalización del etileno se ven alteradas tanto por la mutación de *GGP1* como por las condiciones de estrés por alta irradiancia y temperatura. Un pico de producción de etileno se asocia con una mayor expresión de *ACO* (Nakatsuka y col., 1998). En el presente trabajo frutos mutantes *Slgpp1* tienen menor expresión de estos genes que frutos silvestres en condiciones de invernáculo durante la maduración con excepción de estadio OR. La mayor expresión de *ACO4* y *ACS6* en este estadio explica la mayor producción de etileno observada por Alegre y col. (2020) de frutos mutantes *Slgpp1*. Sin embargo, la mayor expresión de *ETR3* explicaría el retraso en la maduración y el efecto

observado por los tratamientos de ACC y 1-MCP, donde el tratamiento con ACC produce un gran aumento de la producción de H_2O_2 en los estadios de MG y BR mientras que el 1-MCP la reduce drásticamente (Capítulo III). La familia de genes ETR codifica proteínas receptoras que regulan negativamente la acción del etileno (Tieman y col., 2000), y la degradación de estas proteínas estimula la maduración del fruto (Kevany y col., 2007). Sin embargo, la exposición a altas irradiancia y temperatura aumenta la expresión de *ACO4* y *ACS6*, mientras que disminuye la expresión de *ETR3* en los estadios MG y BR de frutos mutantes *Slgpp1*, lo que sugiere un aumento en la producción de etileno, anticipada bajo el estrés lumínico; y una mayor sensibilidad al etileno de los frutos en condiciones de alta irradiancia. Estos resultados sugieren que el etileno y el H_2O_2 comparte la misma vía de señalización que desencadena la maduración del fruto, sin embargo, serían necesarios realizar más estudios que permitan dilucidar cómo el etileno regula la producción de H_2O_2 , y para establecer la manera en que estas dos moléculas se relacionan dentro del proceso del cambio del color del fruto.

CONCLUSIONES

El objetivo general planteado en esta tesis fue determinar el papel del ácido ascórbico en la transición de cloroplasto a cromoplasto durante la maduración del fruto de tomate. Para ello se emplearon dos líneas independientes de plantas de tomate de la variedad Micro-Tom, cada una de ellas con una mutación sobre la secuencia del gen que codifica para la enzima GDP-L-galactosa fosforilasa 1 (GGP1), que provoca la inactividad de esta y por lo tanto reducción en el contenido de ácido ascórbico.

Como resultado del análisis del contenido de ácido ascórbico, del tiempo de maduración, de los parámetros de desarrollo, el análisis del contenido de H₂O₂ y el metabolismo antioxidante y de expresión génica de las dos líneas mutantes *Slgpp1* y el silvestre se concluyó que:

1. La mutación de la primera enzima específica de la síntesis de ácido ascórbico (GGP1), resulta en la reducción del contenido de ácido ascórbico total en frutos en alrededor de 30% - 40%, la cual se mantiene durante la maduración y afecta la proporción de ácido ascórbico oxidado.
2. Las mutaciones en el gen que codifica a GGP1 y la consecuente deficiencia de ácido ascórbico genera un retraso en la maduración de frutos; analizado como el tiempo que tardan en pasar del estadio verde maduro al estadio rojo maduro, posiblemente como consecuencia del aumento en el contenido de clorofila, carotenoides y del desequilibrio en el estado redox.
3. El vínculo entre la principal vía de síntesis del AA y la biosíntesis de la pared celular a través de la GDP-D-manosa, junto con un desequilibrio en la producción de ROS explicaría el mantenimiento de la firmeza en frutos mutantes *Slgpp1* durante la maduración.
4. Frutos deficientes en ácido ascórbico presentan un mayor contenido de glutatión durante la maduración, estableciendo una posible restitución de la capacidad antioxidante.
5. La deficiencia de ácido ascórbico genera una reducción en la producción H₂O₂ en los primeros estadios de la transición de cloroplasto a cromoplasto, que se restituye con los tratamientos de ácido ascórbico. Indicando la participación de ambas moléculas durante la maduración a través del metabolismo redox, posiblemente a nivel de cloroplastos, sin

CONCLUSIONES

- descargar otras fuentes de generación de ROS como la NADPH oxidasa a nivel de apoplasto.
6. Durante la transición de cloroplasto a cromoplasto se observa un pico en la producción de H_2O_2 que no está relacionada con el daño a lípidos, apoyando la hipótesis de una activa participación de H_2O_2 durante la maduración.
 7. El pico de producción de H_2O_2 está ligado a las modificaciones asociadas a la maduración de los frutos inducidas por el etileno. Tratamientos con el precursor de la síntesis de etileno ACC, aumenta significativamente la producción de H_2O_2 , y con un inhibidor de su acción disminuye la producción de H_2O_2 . Ello demuestra que el aumento de la producción de H_2O_2 se integra aguas abajo de los eventos disparados por el etileno.
 8. El etileno afecta el contenido de glutatión y posiblemente la capacidad antioxidante de los frutos, junto con otros procesos relacionados con el metabolismo del glutatión durante la maduración, que no estarían relacionados a la deficiencia de ácido ascórbico.
 9. La deficiencia de ácido ascórbico retrasa la maduración del fruto de tomate, desde el punto de vista del cambio de color, a través de modificaciones en el metabolismo redox. En frutos *slgpp1* se observa una menor producción de H_2O_2 . Dicho proceso puede ser reestablecido con el tratamiento de etileno.
 10. La exposición de los frutos verdes a altas irradiancias genera aumentos del metabolismo y del estrés oxidativo reflejados como aumento en la fotosíntesis, aumento en el QNP, mayor producción de H_2O_2 y el daño a lípidos en los primeros estadios de maduración del fruto. Por otro lado, estos resultados indican una alta capacidad fotosintética del fruto verde.
 11. La deficiencia de ácido ascórbico y el consecuente efecto sobre el metabolismo antioxidante, expone a frutos mutantes *Slgpp1* al estrés generado por las altas irradiancias y temperatura durante los primeros estadios de la maduración.
 12. La expresión de genes que codifican para factores de transcripción de respuesta específica al H_2O_2 , los cuales aumentan su expresión durante la maduración, es menor en frutos deficientes de ácido ascórbico. Estos resultados junto con el retraso en la maduración observada apoyan la idea del H_2O_2 como molécula involucrada durante el proceso de maduración.
 13. Las mutaciones en genes que codifican GGP1 afectan la expresión de genes de la síntesis y sensibilidad al etileno y la expresión de genes para las sHSP involucradas en el cambio de color de frutos de tomate, que son reguladas negativamente por el etileno. Estos resultados indican que las mutaciones en GGP1 afectan la maduración del fruto a través de diversos cambios metabólicos que no necesariamente están relacionados con el

CONCLUSIONES

efecto sobre la capacidad antioxidante generada como consecuencia de la deficiencia de ácido ascórbico.

El análisis del tiempo de maduración, el metabolismo antioxidante, la producción de H_2O_2 , junto con diferentes tratamientos exógenos y el análisis de expresión de genes de plantas de tomate deficientes en ácido ascórbico como producto de la mutación de GGP1, permitieron aportar resultados que establecen el papel del ácido ascórbico en el metabolismo redox generado durante la transición de cloroplasto a cromoplasto. Tomado en su conjunto este trabajo pone en evidencia la participación del H_2O_2 y su modulación por el etileno en el cambio de color durante la maduración del fruto de tomate.

BIBLIOGRAFÍA

- Adalid, A. M.; Roselló, S.; y Nuez, F. (2007). Mejora de la calidad nutritiva en tomate: búsqueda de nuevas fuentes de variabilidad con alto contenido en carotenoides y vitamina C. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas Actas de Horticultura, 48:121-124.
- Adams-Phillips, L.; Barry, C.; Giovannoni, J. (2004). Signal transduction systems regulating fruit ripening. Trends Plant Sci., 9(7): 331-8. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.05.004>
- Agius, F.; Amaya, I.; Botella, M. A.; Valpuesta, V. (2005). Functional analysis of homologous and heterologous promoters in strawberry fruits using transient expression. J. Exp. Bot., 56(409): 37-46. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri004>
- Airianah, O. B.; Vreeburg, R. A. M.; Fry, S. C. (2016). Pectic polysaccharides are attacked by hydroxyl radicals in ripening fruit: Evidence from a fluorescent fingerprinting method. Ann. Bot., 117(3), 441–455. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv192>
- Akram, N. A.; Shafiq, F.; Ashraf, M. (2017). Ascorbic acid: A potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. Front Plant. Sci., 8: 613. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00613>
- Alba, R.; Cordonnier-Pratt, M. M.; Pratt, L. H. (2000). Fruit localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. Plant Physiol., 123: 363-370. <https://doi.org/10.1104/pp.123.1.363>
- Alba, R.; Payton P.; Fei Z.; McQuinn, R.; Debbie, P.; Martin G. B.; Tanksley, S.D.; Giovannoni, J. (2015). Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. Plant Cell, 17:2954-2965. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036053>
- Albacete, A.; Cantero-Navarro, E.; Balibrea, M. E.; Großkinsky, D. K.; González, M. C.; Martínez-Andújar, C.; Smigocki, A. C.; Roitsch, T.; Pérez-Alfocea, F. (2014). Hormonal and metabolic regulation of tomato fruit sink activity and yield under salinity. J. Exp. Bot., 65:6081-6095. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru347>
- Alegre, M. L.; Steelheart, C.; Baldet, P.; Rothan, C.; Just, D.; Okabe, Y.; Ezura, H.; Smirnoff, N.; Gergoff Grozoff, G. E.; Bartoli, C. G. (2020). Deficiency of GDP-L-galactose phosphorylase, an enzyme required for ascorbic acid synthesis, reduces tomato fruit yield. Planta, 251:54. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03345-x>

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, L.; Grierson, D. (2002). Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.*, 53(377):2039-2055. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf072>
- Alhagdow, M.; Mounet, F.; Gilbert, L.; Nunes-Nesi, A.; Garcia, V.; Just, D.; Petit, J.; Beauvoit, B.; Fernie, A. R.; Rothan, C.; Baldet, P. (2007). Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. *Plant Physiol.*, 145:1408-1422. <https://doi.org/10.1104/pp.107.106500>
- Alonso, J. M.; Stepanova, A. N. (2004). The ethylene signaling pathway. *Science*, 306:1513–1515. <https://doi.org/10.1126/science.1104812>
- Amako, K.; Chen, G.; Asada, K. (1994). Separate assay specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiol.*, 35:497-504.
- Amaya, I.; Osorio S.; Martinez-Ferri, E.; Lima-Silva, V.; Doblas, V. G.; Fernández-Muñoz, R.; Fernie, A. R.; Botella, M. A.; Valpuesta, V. (2014). Increased antioxidant capacity in tomato by ectopic expression of the strawberry D-galacturonate reductase gene. *Biotechnol. J.*, 10:3. <https://doi.org/10.1002/biot.201400279>
- Apel, K.; Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55:373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Arnao, M. B.; Cano, A.; Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.*, 73:239-244. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1)
- Arnon, D. I. (1949). Copper Enzymes in isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24: 1-15 <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Aro, E. M.; Virgin, I.; Andersson, B. (1993). Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochem. Biophys.*, 1143:113-134. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90134-2](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90134-2)
- Asada, K. (1994). Production and action of active oxygen in photosynthetic tissue. In: *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. Ed.: Foyer CH. Mullineaux PM. CRC, Boca Raton, FL, pp:77-104

BIBLIOGRAFÍA

- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50:601-639. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.601>
- Asociación Tomate 2000. (2015). Programa para el aumento de la competitividad de la industria del tomate. Informe progresos 2014-2015. Cosme A. Argerich, editor. La Consulta, INTA EEA. <http://inta.gob.ar/unidades/512000> ISSN 1853-6972.
- Badejo, A. A.; Wada, K.; Gao, Y.; Maruta, T.; Sawa, Y.; Shigeoka, S.; Ishikawa, T. (2012). Translocation and the alternative D-galacturonate pathway contribute to increasing the ascorbate level in ripening tomato fruits together with the D-mannose/L-galactose pathway. *J. Exp. Bot.*, 63(1): 229-239. <https://doi.org/10.1093/jxb/err275>
- Bailey-Serres, J.; Mittler, R. (2006). The Roles of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. *Plant Physiol.*, 141:311. <https://doi.org/10.1104/pp.104.900191>
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59:89-113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Baldet, P.; Bres, C.; Okabe, Y.; Mauxion, J. P.; Just, D.; Bournonville, C.; Ferrand, C.; Mori, K.; Ezure, H.; Rothan, C. (2013). Investigating the role of vitamin C in tomato through TILLING identification of ascorbate-deficient tomato mutants. *Plant Biotechnol. J.*, 30:308-314. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.13.0622b>
- Barranco-Medina, S.; Krell, T.; Finkemeier, I.; Sevilla, F.; Lazaro, J. J.; Dietz, K. J. (2007). Biochemical and molecular characterization of the mitochondrial peroxiredoxin PsPrxIIIF from *Pisum sativum*. *Plant Physiol. Biochem.*, 45:729-739. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.07.017>
- Barrantes, W. (2014). Desarrollo de una genoteca de líneas de introgresión entre *Solanum lycopersicum* y *Solanum pimpinellifolium* utilizando herramientas genómicas de alto rendimiento y detección de QTLs implicados en calidad de fruto. Tesis para optar al título de Doctor en Biotecnología. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Universidad Politécnica de Valencia.
- Barsan, C.; Sanchez-Bel, P.; Rombaldi, C.; y col. (2010). Characteristics of the tomato chromoplast proteome revealed by proteomic analysis. *J. Exp. Bot.*, 61:2413-2431. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq070>

BIBLIOGRAFÍA

- Barsan, C.; Zouine, M.; Maza, E.; Bian, W.; Egea, I.; Rossignol, M.; Bouyssie, D.; Pichereaux, C.; Purgatto, E.; Bouzayen, M.; Latché, A.; Pech, J. C. (2012). Proteomic analysis of chloroplast-to-chromoplast transition in tomato reveals metabolic shifts coupled with disrupted thylakoid biogenesis machinery and elevated energy-production components. *Plant Physiol.*, 160:708-725. <https://doi.org/10.1104/pp.112.203679>
- Bartoli, C. G.; Gómez, F.; Gergoff, G.; Guiamet, J. J.; Puntarulo, S. (2005b). Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *J. Exp. Bot.*, 56:1269-1276. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri111>
- Bartoli, C. G.; Gómez, F.; Martínez, D. E.; Guiamet, J. J. (2004). Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Exp. Bot.*, 55:1663-1669. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh199>
- Bartoli, C. G.; Guiamet, J. J.; Kiddle, G.; Pastori, G.; Di Cagno, R.; Theodoulou, F. L.; Foyer, CH. (2005a). Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal L-galactone-1,4-Lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant Cell Environ.*, 28:1073-1081. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01338.x>
- Bartoli, C. G.; Pastori, G.; Foyer, CH. (2000). Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between Complexes III and I. *Plant Physiol.*, 123:335-343. <https://doi.org/10.1104/pp.123.1.335>
- Bartoli, C. G.; Simontacchi, M.; Tambussi, E.; Beltrano, J.; Montaldi, E.; Puntarulo, S. (1999). Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L leaves. *J. Exp. Bot.*, 50:373-381. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.332.375>
- Bartoli, C. G.; Simontacchi, M.; Guiamet, J. J.; Montaldi, E.; Puntarulo, S. (1995). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation during aging of *Chrysanthemum morifolium* flowers. *Plant Sci.*, 104:161-168. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)04020-H](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)04020-H)
- Bartoli, C. G.; Tambussi, E. A.; Fanello, D. D.; Foyer, CH. (2009). Control of ascorbic acid synthesis and accumulation by the incident light red/far red ratio in *Phaseolus vulgaris* leaves. *FEBS Lett*, 583:118-122. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.11.034>
- Bartoli, C. G.; Yu, J.; Gómez, F.; Fernández, L.; McIntosh, L.; Foyer, CH. (2006). Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation

BIBLIOGRAFÍA

- in *Arabidopsis thaliana* leaves. J. Exp. Bot., 57:1621-1631.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erl005>
- Beauchamp, CH.; Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem., 44:276-287.
[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Bhowmik, D.; Kumar, K. S; Paswan, S.; Srivastava, S. (2012). Tomato-A Natural Medicine and Its Health Benefits. J. Pharmacogn. Phytochem., 1:33-43.
- Bian, W.; Barsan, C.; Egea, I.; Purgatto, E.; Chervin, C. H.; Zouine, M.; Latche, A.; Bouzayen, M.; Pech, J. C. (2011). Metabolic and Molecular Events Occurring during Chromoplast Biogenesis. J. Exp. Bot., 16-28. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/289859>
- Bienert, G. P.; Moller, A. L.; Kristiansen, K. A.; Schulz, A.; Moller, M.; Schjoerring, J. K.; y col. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. J. Biol. Chem., 282:1183-1192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603761200>
- Bleecker, A. B.; Estelle, M. A.; Somerville, C.; Kende, H. (1988). Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. Science 241:1086-1089.
<https://doi.org/10.1126/science.241.4869.1086>
- Blokhina, O. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Ann. Bot., 91:179-194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>
- Bose, J.; Rodrigo-Moreno, A.; Shabala, S. (2014). ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. J. Exp. Bot., 65:1241-1257. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert430>
- Bouvier, F.; Backhaus, R. A., Camara, B. (1998). Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. J Biol Chem., 273:30651-30659.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30651>
- Boylan, M. T.; Quail, P. H. (1989). Oat phytochrome is biologically active in transgenic tomatoes. Plant Cell, 1:765–773. <https://doi.org/10.1105/tpc.1.8.765>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem., 72:248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BIBLIOGRAFÍA

- Brandt, S.; Barna P.; Lugasi, A.; Helyes, L. (2006). Lycopene content and colour of ripening tomatoes as affected by environmental conditions. *J. Sci. Food Agr.*, 86:568-572. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2390>
- Bray, E.; Bailey-Serres, J.; Weretilnyk, E. (2000). "Responses to abiotic stress," in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, eds W. Gruissem, B. Buchanan, and R. Jones (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists), 1158-1249.
- Brennan, T.; Frenkel, C. (1977). Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiol.*, 59:411-416. <https://doi.org/10.1104/pp.59.3.411>
- Brummell, D. A. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*, 33(2):103-119. <https://doi.org/10.1071/FP05234>
- Brummell, D. A.; Harpster, M. H. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, 47(1-2):311-339. <https://doi.org/10.1023/A:1010656104304>
- Buet, A.; Moriconi, J. I.; Santa-María, G. E.; Simontacchi, M. (2014). An exogenous source of nitric oxide modulates zinc nutritional status in wheat plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 83:337-345. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.08.020>
- Buettner, G. R.; Jurkiewicz, B. A. (1996). Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. In: *Handbook of Antioxidants*, Cadenas E, Packer L. Eds. Marcel Dekker, Inc., New York, 91-115.
- Bulley, S.; Laing, W. (2016). The regulation of ascorbate biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 33:15-22. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.04.010>
- Bulley, S.; Wright, M.; Rommens, C.; Yan, H.; Rassam, M.; Lin-Wang, K.; Andre, C.; Brewster, D.; Karunairetnam, S.; Allan, A.; Laing, W. A. (2012). Enhancing ascorbate in fruits and tubers through over-expression of the L-galactose pathway gene GDP-L-galactose phosphorylase. *Plant Biotechnol. J.*, 10:390-397. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00668.x>
- Cadenas, E. (1985). Oxidative stress and formation of excited species. In *Oxidative Stress* Edited by Sies H. Academic Press, London, 311-330
- Cai, X.; Zhang, C.; Ye, J.; Hu, T.; Ye, Z.; Li, H.; Zhang, Y. (2015). Ectopic expression of FaGalUR leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress, cold, and salt tolerance in tomato. *Plant Growth Regul.*, 76:187-197. <http://rd.springer.com/journal/10725>

BIBLIOGRAFÍA

- Camara, B.; Hugueney, P.; Bouvier, F.; Kuntz, M.; Monéger, R. (1995). Biochemistry and molecular biology of chromoplast development. *Int. Rev. Cytol.*, 163:175-247. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62211-1](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62211-1)
- Carrara, S.; Pardossi, A.; Soldatini, G. F.; Tognoni, F.; Guidi, L. (2001). Photosynthetic activity of ripening tomato fruit. *Photosynthetica*, 39:75-78. <https://doi.org/10.1023/A:1012495903093>
- Causse, M.; Friguet, C.; Coiret, C.; Lépiciér, M.; Navez, B.; Lee, M.; Holthuysen, N.; Sinesio, F.; Moneta, E.; Grandillo, S. (2010). Consumer preferences for fresh tomato at the European scale: a common segmentation on taste and firmness. *J. Food Sci.*, 75:531-541.
- Caviglia, M.; Mazonra Morales, L. M.; Concellón, A.; Gergoff Grozeff, G. E.; Wilson, M.; Foyer, C. H.; Bartoli, C. G. (2018). Ethylene signaling triggered by low concentrations of ascorbic acid regulates biomass accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radic. Biol. Med.*, 122:130-136. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.032>
- Cejudo, F. J.; Meyer, A. J.; Reichheld, J. P.; Rouhier, N.; Traverso, J. A.; Huber, S. C. (2014). Thiol-based redox homeostasis and signaling. *Front. Plant Sci.*, 5:26. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00266>
- Chamarro, J. (1995). Anatomía y fisiología de la planta. In: F. Nuez. ed. *El cultivo de tomate*. Madrid, Mundi-Prensa: 43-91.
- Chang, C. (1996). The ethylene signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Trends Biochem. Sci.*, 21:129-133. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(96\)80166-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)80166-6)
- Cheesman, K. H.; Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 49:481-93. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625>
- Chen, Q. G.; Bleeker, A. B. (1995). Analysis of ethylene signal-transduction kinetics associated with seedling-growth response and chitinase induction in wild-type and mutant *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 108:597-607. <https://doi.org/10.1104/pp.108.2.597>
- Chen, Z.; Gallie, D. R. (2008). Dehydroascorbate Reductase Affects Non-Photochemical Quenching and Photosynthetic Performance. *J. Biol. Chem.*, 283:21347-21361. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802601200>
- Cheung, A. Y.; McNellis, T.; Piekos, B. (1993). Maintenance of chloroplast components during chromoplast differentiation in the tomato mutant green flesh. *Plant Physiol.*, 101:1223-1229. <https://doi.org/10.1104/pp.101.4.1223>

BIBLIOGRAFÍA

- Chil, A. (1990). A Synopsis of Solanum Subgenus Potatoe (G. Don) D'Arcy (Tuberarium (Dum.) Bitter (s.l.). Feddes Report., 101:209-235. <https://doi.org/10.1002/fedr.19901010502>
- Cocaliadis, M. F.; Fernández-Muñoz, R.; Pons, C.; Orzaez, D.; Granell, A. (2014). Increasing tomato fruit quality by enhancing fruit chloroplast function. A double-edged sword. J. Exp. Bot., 65:4589-4598. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru165>
- Colville, L.; Smirnov, N. (2008). Antioxidant status, peroxidase activity, and PR protein transcript levels in ascorbate-deficient Arabidopsis thaliana vtc mutants. J. Exp. Bot., 59: 3857-3868. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern229>
- Considine, M. J.; Foyer, C.H. (2021). Stress effects on the reactive oxygen species-dependent regulation of plant growth and development. J. Exp. Bot., 72:5795-5806.
- Conklin, P. L.; Saracco, S. A.; Norris, S. R.; Last, R. L. (2000). Identification of ascorbic acid-deficient Arabidopsis thaliana mutants. Genetics, 154:847-856. <https://doi.org/10.1093/genetics/154.2.847>
- Conklin, P. L.; Williams, H. E.; Last, R. L. (1996). Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient Arabidopsis mutant. PNAS., 93(18): 9970-9974. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9970>
- Crisosto, C. H.; Crisosto, G. M.; Garner, D. (2005). Understanding fruit consumer acceptance. Acta Hortic., 682:865-887
- Crisosto, C. H.; Crisosto, G. M.; Echeverria, G.; Puy, J. (2007). Segregation of plum and pluot cultivars according to their organoleptic characteristics. Postharvest Biol. Technol., 44:271-276. <https://doi.org/10.1016/j>
- Cronje, C.; George, G. M.; Fernie, A. R.; Bekker, J.; Kossmann, J.; Bauer, R. (2012). Manipulation of L-ascorbic acid biosynthesis pathways in Solanum lycopersicum: elevated GDP-mannose pyrophosphorylase activity enhances L-ascorbate levels in red fruit. Planta, 235:553-564. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1525-6>
- Davey, M. W.; Van Montagu, M.; Inzé, D.; Sanmartin, M.; Kanellis, A.; Smirnov, N.; y col. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. J. Sci. Food Agric., 80:825-860. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:73.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:73.0.CO;2-6)

BIBLIOGRAFÍA

- Decros, G.; Baldet, P.; Beauvoit, B.; Stevens, R.; Flandin, A.; Colombie, S.; Gibon, Y.; Pétriacq, P. (2019). Get the balance right: ROS homeostasis and redox signalling in fruit. *Front Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01091>
- DeEll, J. R.; Toivonen P. M. A. (2003). Use of chlorophyll fluorescence in postharvest quality assessments of fruits and vegetables. En: *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*, DeEll JR y Toivonen PMA (eds), 204-246.
- Del Longo, O. T.; Koroch, A. R.; Trippi, V. S. (1997). Preservación o degradación de clorofilas en hojas de avena por efecto del ácido ascórbico. *Agriscientia XIV*: 11-17.
- Del Río, L. A.; López-Huertas, E. (2016). ROS generation in peroxisomes and its role in cell signalling. *Plant Cell Physiol.*, 57:1364-1376. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw076>
- Demming, A. (1992). Photoprotection and Other Responses of Plants to High Light Stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43:599-626.
- Desikan, R.; y col. (2006) Ethylene-induced stomatal closure in Arabidopsis occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. *Plant J.*, 47:907-916. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02842.x>
- DeSimone, A.; Hubbard, R.; Viñegra de la Torre, N.; Velappan, Y.; Wilson, M.; Considine, M. J.; Soppe, W. J. J.; Foyer, CH. (2017). Redox changes during the cell cycle in the embryonic root meristem of Arabidopsis thaliana. *Antioxid. Redox Signaling*, 27:1505-1519. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6959>
- Di Matteo, A.; Sacco, A.; Anacleria, M.; y col. (2010). The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. *BMC Plant Biol.*, 10:163. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-163>
- Dietz, K. J.; Mittler, R.; Noctor, G. (2016) Recent progress in understanding the role of reactive oxygen species in plant cell signaling. *Plant Physiol.*, 171:1535-1539. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00938>
- Dolatabadian, A.; Jouneghani, R. S. (2009). Impact of exogenous ascorbic acid on antioxidant activity and some physiological traits of common bean subjected to salinity stress. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.*, 37:165-172. <https://doi.org/10.15835/nbha3723406>
- Dong, J. G.; Fernández-Maculet, J. C.; Yang, S. F. (1992). Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:9789-9793. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.20.9789>

BIBLIOGRAFÍA

- Dowdle, J.; Ishikawa, T.; Gatzek, S.; Rolinski, S.; Smirnoff, N. (2007). Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactosephosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J.*, 52:673-689. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03266.x>
- Downs, C. A.; Ryan, S. L.; Heckathorn, S. A. (1999). The chloroplast small heat-shock protein: evidence for a general role in protecting photosystem II against oxidative stress and photoinhibition. *J. Plant Physiol.* 155:488-496. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(99\)80043-1](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(99)80043-1)
- Dumville, J. C., Fry, S. C. (2003). Solubilization of tomato fruit pectins by ascorbate: a possible non-enzymatic mechanism of fruit softening. *Planta* 217:951961. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1061-0>
- Egea, I.; Bian, W.; Barsan, C.; Jauneau, A.; Pech, J. C.; Latche, A.; Li, Z.; Chervin, C. (2011). Chloroplast to chromoplast transition in tomato fruit: spectral confocal microscopy analyses of carotenoids and chlorophylls in isolated plastids and time-lapse recording on intact live tissue. *Ann. Bot.* 108:291-297. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr140>
- Esquinas-Alcazar, J.; Núñez, F. (1995). Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. En: F. Nuez. ed. *El cultivo del tomate*. Madrid, Mundi-Prensa, 13-42.
- Feierabend, J.; Winkelhüsener, T. (1982). Nature of photooxidative events in leaves treated with chlorosisinducing herbicides. *Plant Physiol.*, 70:1277-1282. <https://doi.org/10.1104/pp.70.5.1277>
- Fenech, M.; Amaya, I.; Valpuesta, V.; Botella, M. A. (2019). Vitamin C Content in Fruits: Biosynthesis and Regulation. *Front. Plant Sci.*, 9:2006. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.02006>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO-STAT) (2015) En: www.faostat.fao.org.
- Foote, C. H.; Clennan, E. (1995). Properties and Reactions of Singlet Dioxigen. *Active Oxygen in Chemistry Volume 2*. ISBN: 978-0-7514-0371-8.
- Foyer, CH. (2005). Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *Plant Cell*, 7:1866-1875. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.03358>

BIBLIOGRAFÍA

- Foyer, CH.; Kyndt, T; Hancock, R. D. (2020). Vitamin C in plants: novel concepts, new perspectives and outstanding issues. *Antioxid. Redox Signaling*. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7819>.
- Foyer, CH.; Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17:1866-1875. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033589>
- Foyer, CH.; Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiol.*, 155:2-18. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167569>
- Foyer, CH.; Noctor, G. (2013). Redox signaling in plants. *Antiox. Red Signal.*, 18:2087-2090. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5278>
- Foyer, CH.; Noctor, G. (2016). Stress-triggered redox signaling: what's in pROSPect?. *Plant Cell Environ.*, 39:951-964. <https://doi.org/10.1111/pce.12621>
- Foyer, CH.; Shigeoka, S. (2011). Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis Focus Issue on Enhancing Photosynthesis. *Plant Physiol.*, 155(1):93-100. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166181>
- Fraser, P. M.; Truesdale, M. R.; Bird, C. R.; Schuch, W.; Bramley, P. M. (1994). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. *Plant Physiol.* 105(1):405–413. <https://doi.org/10.1104/pp.105.1.405>
- Fridowich, I. (1978). The Biology of oxygen radicals. *Science*, 201:875-88. <https://doi.org/10.1126/science.21050>
- Fry, S. C. (2004). Primary cell wall metabolism: Tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist*, 161(3):641–675. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.00980.x>
- Gallie, D. R. (2013). L-Ascorbic acid: A multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica*, 795964. 10.1155/2013/795964
- Galvez-Valdivieso, G.; Mullineaux, P. M. (2010). The role of reactive oxygen species in signaling from chloroplasts to the nucleus. *Plant Physiol.*, 138:430-439. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01331.x>
- Gapper, N. E.; McQuinn, R. P.; Giovannoni, J. J. (2013). Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Mol. Biol.*, 82:575–591. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0050-3>

BIBLIOGRAFÍA

- Gautier, H.; Diakou-verdin, V.; Bénard, C.; Reich, M.; Buret, M.; Bourgaud, F.; Poëssel, J. L.; Carisveyrat, C.; Génard, M. (2008.) How Does Tomato Quality (Sugar, Acid, and Nutritional Quality) Vary with Ripening Stage, Temperature, and Irradiance? *J. Agric. Food Chem.*, 56:1241-1250. <https://doi.org/10.1021/jf072196t>
- Gergoff Grozeff, G. E.; Senn, M. E.; Alegre, M.; Chaves, A. R.; Bartoli, C. G. (2016). Nocturnal low irradiance pulses improve fruit yield and lycopene concentration in tomato. *Sci. Hortic*, 203:47-52. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.001>
- Gest, N.; Gautier, H.; Stevens, R. (2013). Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *J. Exp. Bot.*, (64)1:33-53. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers297>
- Ghanta, S.; Datta, R.; Bhattacharyya, D.; Sinha, R.; Kumar, D.; Hazra, S.; Bose Mazumdar, A.; Chattopadhyay, S. (2014). Multistep involvement of glutathione with salicylic acid and ethylene to combat environmental stress. *J. Plant Physiol.*, 171(11):940-950. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.002>
- Gilbert, L.; Alhagdow, M.; Nunes-Nesi, A.; Quemener, B.; Guillon, F.; Bouchet, B.; ... Baldet, P. (2009). GDP-d-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. *Plant J.* 60(3):499-508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03972.x>
- Gill, S. S.; Khan, N. A.; Anjum, N. A.; Tuteja, N. (2011). Amelioration of cadmium stress in crop plants by nutrients management: morphological, physiological and biochemical aspects. *En Plant Nutrition and Abiotic Stress Tolerance III, Plant Stress 5 (Special Issue 1)*, eds N. A. Anjum and F. Lopez-Lauri (Ikenobe: Global Science Books Ltd., UK), 1-23.
- Gill, S. S.; Tuteja N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 48:909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Giovannoni, J.; Nguyen, C.; Ampofo, B.; Zhong, S.; Fei, Z. (2017). The epigenome and transcriptional dynamics of fruit ripening. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 68:61-84. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040906>
- Gómez, F.; Fernández, L.; Gergoff, G.; Guamet, J. J.; Chaves, A.; Bartoli, C. G. (2008). Heat shock increases mitochondrial H₂O₂ production and extends postharvest life of spinach leaves. *Postharvest Biol. Technol.*, 49:229-234. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.02.012>

BIBLIOGRAFÍA

- Gómez, J. M.; Jiménez, A.; Olmos, E.; Sevilla, F. (2004). Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. *J. Exp. Bot.*, 55:119-130. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh013>
- Gong, B.; Sun S.; Yan Y.; Jing X.; Shi Q. (2018). Glutathione Metabolism and Its Function in Higher Plants Adapting to Stress Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants. ISBN:978-3-319-75087-3.
- Gonorazky, G.; Laxalt, A. M.; Testerink, C.; Munnik, T.; De La Canal, L. (2008). Phosphatidylinositol 4-phosphate accumulates extracellularly upon xylanase treatment in tomato cell suspensions. *Plant Cell Environ.* 31:1051-1062. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01818.x>
- Green, M. A.; Fry, S. C. (2005). Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature*, 433:83-88. <https://doi.org/10.1038/nature03172>
- Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.*, 106:207-212. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90139-6)
- Guo, H.; Ecker, J. R. (2000). The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7:40-49. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.11.011>
- Gupta, K.; Sengupta, A.; Chakraborty, M.; Gupta, B. (2016). Hydrogen peroxide and polyamines act as double-edged swords in plant abiotic stress responses. *Front. Plant Sci.*, 7:1-19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01343>
- Guzmán, P.; Ecker, J. R. (1990). Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*, 2:513-523. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.6.513>
- Hamilton, E. W.; Heckathorn, S. A. (2001). Mitochondrial Complex I adaptations to NaCl is protected by antioxidant and small heat shock proteins, whereas Complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiol.* 126:1266-1274. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1266>
- Harker, F. R.; Redgwell, R. J.; Hallett, I. C.; Murray, S. H.; Carter, G. (1997). Texture of Fresh Fruit. *Hortic. Rev.*, 20. <https://doi.org/10.1002/9780470650646.ch2>

BIBLIOGRAFÍA

- Hendry, G. A.; Houghton, J. D.; Brown, S. B. (1987). The degradation of chlorophyll a biological enigma *The New Phytol.*, 107:255-302. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb00181.x>
- Hetherington, S. E.; Smillie, R. M.; Davies, W. J. (1998). Photosynthetic are used to facilitate reduction of oxalacetate to malate activities of vegetative and fruiting tissues of tomato. *J. Exp. Bot.*, 15:1173-1181.
- Ho, L. C.; Hewitt, J. D. (1986). Fruit development. In: J.G. Atherton & J. Rudich (Eds.), *The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement*, 201-239.
- Hobson, G. E.; Davies, J. N. (1976). Protein and enzyme change in tomato fruit in relation to blotchy ripening and potassium nutrition. *J. Sci. Food Agric.*, 27:15-22. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740270104>
- Huan, C.; Jiang, L.; An, X.; Yu, M.; Xu, Y.; Ma, R.; Yu, Z. (2016). Potential role of reactive oxygen species and antioxidant genes in the regulation of peach fruit development and ripening. *Plant Physiol. Biochem.*, 104:294-303. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.013>
- Huang, H.; Ullah, F.; Zhou, D. X.; Yi, M.; Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Front. Plant Sci.*, 10(800). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
- Ilahy, R.; Tlili, I.; Siddiqui, M. W.; Hdidier, C.; Lenucci, M. S. (2019). Inside and Beyond Color: Comparative Overview of Functional Quality of Tomato and Watermelon Fruits. *Front. Plant Sci.*, 10:769. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00769>
- Ioannidi, E.; Kalamaki, M. S.; Engineer, C.; Pateraki, I.; Alexandrou, D.; Mellidou, I.; ... Kanellis, A. K. (2009). Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. *J. Exp. Bot.*, 60(2):663-678. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern322>
- Jahns, P.; Latowski, D.; Strzalka, K. (2009). Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, (1787)1:3-14. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.09.013>
- Jiang, C. D.; Gao, H. Y.; Zou, Q.; Jiang, M. G.; Li, L. H. (2006). Leaf orientation, photorespiration and xanthophyll cycle protect young soybean leaves against high irradiance in field. *J. Exp. Bot.*, 55:87-96. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.10.003>

BIBLIOGRAFÍA

- Jimenez, A.; Creissen, G.; Kular, B.; Firmin, J.; Robinson, S.; Verhoeyen, M.; Mullineaux, P. (2002). Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta*, 214:751-758. <https://doi.org/10.1007/s004250100667>
- Jiménez, A.; Hernández, J. A.; Del Río, L. A.; Sevilla, F. (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.*, 114:275-284. <https://doi.org/10.1104/pp.114.1.275>
- Jimenez, A.; Hernandez, J. A., Pastori, G.; Del Rio, L. A., Sevilla, F. (1998). Role of the Ascorbate-Glutathione Cycle of Mitochondria and Peroxisomes in the Senescence of Pea Leaves. *Plant Physiol.*, 118(4):1327-35. <https://doi.org/10.1104/pp.118.4.1327>
- Jiménez, A.; Martí, M. C.; Camejo, D.; Sevilla, F. (2019). Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide Metabolism in Chloroplasts. In: Nitric oxide and hydrogen peroxide: Signalling in higher plants. Eds.: Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ. Springer Nature Switzerland AG, 107-144.
- Kader, A. A. (2008). Flavor quality of fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.*, 11(88):1863-1868. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3293>
- Keller, R.; Springer, F.; Renz, A.; Kossmann, J. (1999). Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorylase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence. *Plant J.*, (19)2:131-141. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00507.x>
- Kevany, B. M.; Tieman D. M.; Taylor M.G.; Dal Cin V.; Klee H. J. (2007). Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *Plant J.* 51:458-467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03170.x>
- Kieber, J. J.; Rothenburg, M.; Roman, G.; Feldmann, K. A.; Ecker, J. R. (1993). CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*, 72:427-441. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90119-b](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90119-b)
- Kitts, D. D. (1997). An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. *Trends. Food Sci. Technol.*, 8(6):198-203. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01033-9](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01033-9)
- Klee, H.; Giovannoni, J. (2011). Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annu. Rev. Genet.*, 45:41-59. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132507>
- Krause, G. H.; Kirk, M.; Heber, U.; Osmond, C. B. (1978). O₂-dependent inhibition of photosynthetic capacity in intact isolated chloroplasts and isolated cells from spinach

BIBLIOGRAFÍA

- leaves illuminated in the absence of CO₂. *Planta*, 142:229-33.
<https://doi.org/10.1007/BF00388218>
- Kumar, V.; Irfan, M.; Ghosh, S.; Chakraborty, N.; Chakraborty, S.; Datta, A. (2016). Fruit ripening mutants reveal cell metabolism and redox state during ripening. *Protoplasma*, 253:581-594. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0836-z>
- Kyle, D. J.; Arntzen, C. J.; Ohad, I. (1983). The herbicide-binding 32 KD polypeptide is the primary site of photoinhibition damage. *Plant Physiol. Suppl.*, 72(1):52.
- Kyoko, H. T. (2016). Fruit Ripening in Tomato and Its Modification by Molecular Breeding Techniques. In: H. Ezura y col. (eds.), *Functional Genomics and Biotechnology in Solanaceae and Cucurbitaceae Crops. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 70. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48535-4_10
- Li, H.; Li, Y.; Deng, H.; Sun, X.; Wang, A.; Tang, X.; Gao, Y.; Zhang, N.; Wang, L.; Yang, S.; Liu, Y.; Wang, S. (2018). Tomato UV-B receptor SIUVR8 mediates plant acclimation to UV-B radiation and enhances fruit chloroplast development via regulating SIGLK2. *SCIENTIFIC REPORTS*, 8:6097. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24309-y>
- Li, J. M.; Wheatcroft, S.; Fan, L. M.; Kearney, T.; Shah, A. M. (2004). Opposing roles of p47phox in basal versus angiotensin II-stimulated alterations in vascular O₂-production, vascular tone, and mitogen-activated protein kinase activation. *Circulation*, 109:1307-1313. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000118463.23388.B9>
- Linster, C. L.; Clarke, S. G. (2008). L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2. *Trends Plant Sci.*, 13:567-573. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.08.005>
- Lichtenthaler, H. K.; Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Transac.*, 603:591-592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- Liu, L. H.; Zabarás, D.; Bennett, L. E.; Aguas, P.; Woonton, W. B. (2009). Effect of UV-C, red light and sun light on the carotenoid content and physical qualities of tomatoes during post-harvest storage. *Food Chem.*, 115:495-500. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.042>
- Liu, Y.; Shi, Y.; Su D.; Lu W.; Li, Z. (2021). SIGRAS4 accelerates fruit ripening by regulating ethylene biosynthesis genes and *SIMADS1* in tomato. *Hortic. Res.*, 8(3). <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00431-9>

BIBLIOGRAFÍA

- Locato, V.; Cimini, S.; De Gara, L. (2013). Strategies to increase vitamin C in plants: from plant defense perspective to food biofortification. *Front. Plant Sci.*, 4:152. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00152>
- Magné, C.; Larher, F. (1992). High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Anal. Bioch.*, 200:115-118. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90285-f](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90285-f)
- Martí, M. C.; Camejo, D.; Olmos, E.; Sandalio, L. M.; Fernández-García, N.; Jiménez, A.; Sevilla, F. (2009). Characterization and changes in the antioxidant system of chloroplasts and chromoplasts isolated from green and mature pepper fruits. *Plant Biol.*, 11:613-624. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00149.x>
- Martí, M. C.; Camejo, D.; Vallejo, F.; Romojaro, F.; Bacrizo, S.; Palma, J. M.; Sevilla, F.; Jiménez, A. (2011). Influence of fruit ripening stage and harvest period on the antioxidant content of sweet pepper cultivars. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 66:416-423. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0249-x>
- Martí, M. C.; Olmos, E.; Calvete, J. J.; Díaz, I.; Barranco-Medina, S.; Whelan, J.; Lázaro, J. J.; Sevilla, F.; Jiménez, A. (2009). Mitochondrial and nuclear localization of a novel pea thioredoxin: identification of its mitochondrial target proteins. *Plant Physiol.*, 150:646-657. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138073>
- Martínez, D.; Bartoli, C. G.; Grbic, V.; Guiamet, J. J. (2007). Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L) common to leaf senescence induced by different factors. *J. Exp. Bot.*, 58:1099-1107. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl270>
- Mateos, R. M.; Jiménez, A.; Román, P.; Romojaro, F.; Bacarizo, S.; Leterrier, M.; Gómez, M.; Sevilla, F.; Del Río, L. A.; Corpas, F. J.; Palma, J. M. (2013). Antioxidant systems from pepper (*Capsicum annuum* L.): involvement in the response to temperature changes in ripe fruits. *Int. J. Mol. Sci.*, 14:9556-9580. <https://doi.org/10.3390/ijms14059556>
- McCollum, J. P. (1954). Effect of light on the formation of carotenoids in tomato fruits. *Food Res.*, 19:182-189.
- Mersmann, S.; Bourdais, G.; Rietz, S.; Robatzek, S. (2010). Ethylene signaling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiol.* 154:391-400. <https://doi.org/10.1104/pp.110.154567>

BIBLIOGRAFÍA

- Meyer, Y.; Belin, C.; Delorme-Hinoux, V.; Reichheld, J. P.; Riondet, C.; Meyer, Y. (2012). Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antiox. Redox. Sign.*, 17:1124-1160. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4327>
- Mhamdi, A.; Van Breusegem, F. (2018). Reactive oxygen species in plant development. *Development.*, 145:164376. <https://doi.org/10.1242/dev.164376>
- Miller, E. W; Dickinson, B. C.; Chang, C. J. (2010). Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:15681-15686. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005776107>
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends Plant Sci.*, 22:11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M.; Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.*, 9:490-498.
- Miyake, C.; Asada, K. (1992). Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product, monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.*, 33:541-553.
- Mortensen, A.; Skibsted, L. H. (1997). Importance of carotenoids structure in radical scavenging reactions *J. Agric. Food Chem.*, 45:2970-2977. <https://doi.org/10.1021/jf970010s>
- Mounet-Gilbert, L.; Dumont, M.; Ferrand, C.; Bournonville, C.; Monier, A.; Jorly, J.; ... Baldet, P. (2016). Two tomato GDP-D-mannose epimerase isoforms involved in ascorbate biosynthesis play specific roles in cell wall biosynthesis and development. *J. Exp. Bot.*, 67(15):4767-4777. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw260>
- Muller-Moule, P; Conklin, P. L; Niyogi, K. N. (2002). Ascorbate Deficiency Can Limit Violaxanthin De-Epoxidase Activity in Vivo. *Plant Physiol.*, 128:970-977. <https://doi.org/10.1104/pp.010924>
- Nakatsuka, S.; Murachi, H.; Okunishi, S.; Shiomi, R.; Nakano, Y.; Kubo, A.; Inaba, E. (1998). Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening, *Plant Physiol.* 11:1295-1305. <https://doi.org/10.1104/pp.118.4.1295>

BIBLIOGRAFÍA

- 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. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031914>
- Noctor, G.; Foyer, CH. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49:249-279. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>
- Noctor, G.; Reichheld, J. P.; Foyer, CH. (2017). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars Cell Dev. Biol.*, 80:3-12. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.07.013>
- Olives, A. I.; Camara, M.; Sanchez, M. C.; Fernandez, V.; Lopez Saenz de Tejada, M. (2006). Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Food Chem.*, 95:328-336.
- Osorio, S.; Alba, R.; Damasceno, C. M. B.; Lopez-Casado, G.; Lohse, M.; Zanon, M. I.; ...Fornier, A. R. (2011). Systems biology of tomato fruit development: Combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (*nor*, *rin*) and ethylene receptor (*Nr*) mutants reveals novel regulatory interactions. *Plant Physiol.*, 157(1):405-425. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175463>
- Overmyer, K.; Brosché, M.; Kangasjärvi, J. (2003). Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci.* 8:335-342. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00135-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00135-3)
- Palma, J. M.; Sevilla, F.; Jiménez, A.; Del Río, L. A.; Corpas, F. J.; Álvarez de Morales P.; Camejo, D. M. (2015). Physiology of pepper fruit and the metabolism of antioxidants: chloroplasts, mitochondria and peroxisomes. *Ann. Bot.*, 116:627-636. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv121>
- Park, H. Y.; y col. (2011). AtERF71/HRE2 transcription factor mediates osmotic stress response as well as hypoxia response in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 414:135-141. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.039>
- Pastori, G. M.; Kiddle, G.; Antoniow, J.; Bernard, S.; Veljovic-Jovanovic, S.; Verrier, P. J.; Noctor, G.; Foyer, CH. (2003). Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell* 15:939-951. <https://doi.org/10.1105/tpc.010538>

BIBLIOGRAFÍA

- Patterson, B. D.; MacRae, E. A.; Ferguson, I. B. (1984). Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Anual Biochem.*, 139:487-492. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90039-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90039-3)
- Pavet, V.; Olmos, E.; Kiddle, G.; Mowla, S.; Kumar, S.; Antoniw, J.; Alvarez, M. E.; Foyer, CH. (2005). Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in arabidopsis. *Plant Physiol.*, 139:1291-1303. <https://doi.org/10.1104/pp.105.067686>
- Peng, J.; Li, Z.; Wen, X.; Li, W.; Shi, H.; Yang, L.; Zhu, H.; Guo, H. (2014). Saltinduced stabilization of EIN3/EIL1 confers salinity tolerance by deterring ROS accumulation in Arabidopsis. *PLoS Genet.*, 10:e1004664. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004664>
- Peralta, I. E.; Spooner, D. M.; Knapp, S. (2008). Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (Solanum sections Lycopersicoides, Juglandifolia, Lycopersicon; Solanaceae). *Syst. Bot. Monogr.*, 84:1-186.
- Peters, J. L.; Van Tuinen, A.; Adamse, P.; Kendrick, R. E.; Koornneef, M. (1989). High pigment mutants of tomato exhibit high sensitivity of phytochrome action. *J. Plant Physiol.*, 134:661-666. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(89\)80024-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(89)80024-0)
- Pignocchi, C., Foyer, CH. (2003). Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6:379-389. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00069-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00069-4)
- Pion, C. J. (1981). Effects of cycloheximide and light on leaf senescence in maize and hydrangea. *Plant Cell Physiol.*, 22:847-85.
- Poor, P. y col. (2015). Salt stress-induced production of reactive oxygen- and nitrogen species and cell death in the ethylene receptor mutant Never ripe and wild type tomato roots. *Plant Physiol. Biochem.*, 97:313-322. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.10.021>
- Potters, G.; DeGara, L.; Asard, H.; Horemans, N. (2002). Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol. Biochem.*, 40:537-548. 1 [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01414-6](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01414-6)
- Powell, A. L.; Nguyen, C. V.; Hill, T. (2012). Uniform ripening encodes a Golden 2-like transcription factor regulating tomato fruit chloroplast development. *Science* 336:1711-1715. <https://doi.org/10.1126/science.1222218>
- Powels, S. B. (1984). Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35:14-44. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.000311>

BIBLIOGRAFÍA

- Prescott, A.; John, P. (1996). DIOXYGENASES: Molecular Structure and Role in Plant Metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47:245-271. <https://doi.org/10.1021/pr801046m>
- Qin, G.; Meng, X.; Wang, Q.; Tian, S. (2009). Oxidative damage of mitochondrial proteins contributes to fruit senescence: a redox proteomics analysis. *J. Proteome Res.*, 8:2449-2462.
- Queval, G.; Noctor, G. (2007). A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Anal Bioch.*, 363:58-69. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.01.005>
- Quinet, M.; Angosto, T.; Yuste-Lisbona, F. J.; Blanchard-Gros, R.; Bigot, S.; Martinez, J. P.; Lutts, S. (2019). Tomato Fruit Development and Metabolism. *Frontiers*, 10:1514 <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01554>
- Raffo, A.; Salucci, M.; Azzini, E.; Berton E. V.; Quaglia, G. B.; Fogliano, V.; Graziani, G.; y La Malfa, G. (2003). Nutritional characteristics of greenhouse cherry tomatoes. *Acta Hort.*, 19:11-19.
- Ramos-Artuso, F.; Galatro, A.; Lima, A.; Batthyány, C.; Simontacchia, M. (2019). Early events following phosphorus restriction involve changes in proteome and affects nitric oxide metabolism in soybean leaves. *Environ. Exp. Bot.*, 161:203-217.
- Rao, M. V.; Lee, H. I.; Davis, K. R. (2002). Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant J.*, 32:447-456. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01434.x>
- Reiter, W. D.; Vauzin, G. F. (2001). Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. *Plant Mol. Biol.*, 47:95-113.
- Roca, M.; Pérez-Gálvez, A. (2021). Metabolomics of Chlorophylls and Carotenoids: Analytical Methods and Metabolome-Based Studies. *Antioxidants*, 10(10):1622. <https://doi.org/10.3390/antiox10101622>
- Rodoni, L.; Casadie, N.; Concellón, A.; Chaves, A.; Vicente, A. (2009). Effect of short-term ozone treatments on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit quality and cell wall degradation. *J. Agric. Food Chem.*, 58:594–599. <https://doi.org/10.1021/jf9029145>

BIBLIOGRAFÍA

- Rose, J.; Catalá, C.; Gonzalez-Carranza, Z. H.; Roberts, J. A. (2003). Cell Wall Disassembly. *Annu. plant rev. online*, 8. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0075>
- Sacks, E. J.; Francis, D. M. (2001). Genetic and environmental variation for tomato flesh color in a population of modern breeding lines. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 126:221-226. <https://doi.org/10.21273/JASHS.126.2.221>
- Saito, T.; Matsukura, C.; Ban, Y.; Shoji, K.; Sugiyama, M.; Fukuda, N.; Nishimura, S. (2008). Salinity stress affects assimilate metabolism at the gene-expression level during fruit development and improves fruit quality in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 77:61-68.
- Scholander, P. F.; Hammel, H. T.; Bradstreet, E. D.; Hemmingsen, E. A. (1965). Sap pressure in vascular plants. *Science*, 148:339-346. <https://doi.org/10.1126/science.148.3668.339>
- Schreiber, U.; Hormann, H.; Asada, K.; Neubauer, C. (1995). O₂-dependent electron flow in intact spinach chloroplasts: Properties and possible regulation of the Mehler-Ascorbate-Peroxidase cycle. En: Mathis, P. (ed.). *Photosynthesis: From light to biosphere*, Vol. II. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 813-818.
- Sewelam, N. y col. (2013.) Ethylene response factor 6 is a regulator of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis. *PLoS One* 8, e70289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070289>
- Shukla, V.; Upadhyay, R.; Tucker, M.; Giovannoni, J.; Rudrabhatla, S.; Matto, A. (2017). Transient regulation of three clustered tomato class-I small heat-shock chaperone genes by ethylene is mediated by SIMADSRIN transcription factor. *Sci. Rep.*, 7-6474. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06622-0>
- Sies, H.; Stahl, W. (1998). Lycopene: Antioxidant and Biological Effects and its Bioavailability in the Human. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 218(2):121-124. <https://doi.org/10.3181/00379727-218-44285a>
- Smillie, R. M.; Hetherington, S. E.; Davies, W. J. (1999). Photosynthetic activity of the calyx, green shoulder, pericarp, and locular parenchyma of tomato fruit. *J. Exp. Bot.*, (50)334:707-718.
- Smirnoff, N.; Wheeler, G. L. (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 35:291-314. <https://doi.org/10.1080/10409230008984166>

BIBLIOGRAFÍA

- Sorensen, G. J.; Kristensen, N. T.; Loeschcke, V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.*, 6:1025-1037. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00528.x>
- Steelheart, C.; Galatro, A.; Bartoli, C. G.; Gergoff Grozeff, G. E. (2019b). Nitric oxide and hydrogen peroxide: signals in fruit ripening. In: Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ (eds) Nitric oxide and hydrogen peroxide: signalling in higher plants. Springer Nature, Cham.:175-200. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11129-8_9
- Stevens, M. A.; Rick, C. M. (1986). Genetics and breeding. In: Atherton, J.G. y Rudich, J. eds. The Tomato Crop. London. Chapman & Hall, 35-100.
- Stevens, R.; Buret, M.; Duffé, P.; Garchery, C.; Baldet, P.; Rothan, C.; Causse, M. (2007). Candidate genes and quantitative trait loci affecting fruit ascorbic acid content in three tomato populations. *Plant Physiol.*, 143:1943-1953. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091413>
- Stransky, H.; Hager, A. (1970). Carotenoid pattern and occurrence of light induced xanthophyll cycle in various classes of algae. *Arch. Mikrobiol.*, 73:315-323.
- Tambussi, E.; Bartoli, C. G.; Guiamet, J. J.; Beltrano, J.; Araus, J. L. (2000). Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiol. Plant.*, 108:398-404. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.t01-1-100409.x>
- Tambussi, E.; Graciano, C. (2010). La fluorescencia modulada de la clorofila: método del pulso saturante. En: Técnicas de medición en ecofisiología vegetal: conceptos y procedimientos. M.E. Fernández, J. Gyenge (eds). Ed. INTA. Buenos Aires. pp:129-140.
- Tanaka, A.; Fujit, K.; Kikuchi, K. (1974). Nutrio-physiological studies on the tomato plant. III. Photosynthetic rate on individual leaves in relation to dry matter production of plants. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 20:173-183.
- Tang, W.; Charles, T. M.; Newton, R. J. (2005). Overexpression of the pepper transcription factor CaPF1 in transgenic Virginia pine (*Pinus Virginiana* Mill.) confers multiple stress tolerance and enhances organ growth. *Plant Mol. Biol.* 59:603-617.
- Templar, J.; Kon, S. P.; Milligan, T. P.; Newman, D. J.; Raftery, M. J. (1999). Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 14:946-951. <https://doi.org/10.1093/ndt/14.4.946>

BIBLIOGRAFÍA

- Thirumalaikumar, V. P.; Devkar V.; Mehterov N.; Ali, S.; Ozgur, R.; Turkan, I.; Mueller-Roeber, B.; Balazadeh S. (2018). NAC transcription factor JUNGBRUNNEN1 enhances drought tolerance in tomato. *Plant Biotechnol. J.*, 16:354-366. <https://doi.org/10.1111/pbi.12776>
- Tian, S.; Qin, G.; Li, B. (2013) Reactive oxygen species involved in regulating fruit senescence and fungal pathogenicity. *Plant Mol. Biol.*, 82:593-602. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0035-2>
- Tieman, D. M.; Taylor, M. G.; Ciardi, J. A.; Klee, H. J. (2000). The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:5663-5668. <https://doi.org/10.1073/pnas.090550597>
- Tijsken, L. M.; Evelo, R. W. (1994). Modeling colour of tomatoes during postharvest storage. *Postharvest Biol. Technol.*, 4:85-89. ISSN: 0925-5214.
- Valcárcel, G. M. (2009). Optimización del proceso de evaluación y selección de germoplasma de tomate por características de calidad organoléptica: Uso de la tecnología NIR y sensores electrónicos. Tesis Doctoral. Escola Superior de Tecnologia e Ciències Experimentals. Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural. Universitat Jaume I de Castellón. 201 p
- Voxeur, A.; Gilbert, L.; Rihouey, C.; Driouich, A.; Rothan, C.; Baldet, P.; Lerouge, P. (2011). Silencing of the GDP-d-mannose 3,5-epimerase affects the structure and cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II and plant growth in tomato. *J. Biol. Chem.*, 286:8014-8020. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.198614>
- Wang, B.; Wang, J.; Feng, X.; Lin, L.; Zhao, Y.; Jiang, W. (2009). Effects of 1-MCP and exogenous ethylene on fruit ripening and antioxidants in stored mango. *Plant Growth Regul.*, 57:185-192. <https://doi.org/10.1007/s10725-008-9335-y>
- Waszczak, C.; Carmody, M.; Kangasjärvi, J. (2018). Reactive oxygen species in plant signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 69:209-236. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040322>
- Wi, S. J.; Ji, N. R.; Park, K. Y. (2012). Synergistic biosynthesis of biphasic ethylene and reactive oxygen species in response to hemibiotrophic *Phytophthora parasitica* in tobacco plants. *Plant Physiol.*, 159:251-265. <https://doi.org/10.1104/pp.112.194654>

BIBLIOGRAFÍA

- Wu, A.; Devi Allu, A.; Garapati, P.; Siddiqui, H.; Dortay, H.; Zanol, M.I.; Asensi-Fabado, M.A.; Munné-Bosch, S.; Antonio, C.; Tohge, T.; Fernie, A.R.; Kaufmann, K.; Xue, G.P.; Mueller-Roeber, B.; Balazadeh S. (2012). JUNGBRUNNEN1, a Reactive Oxygen Species–Responsive NAC Transcription Factor, Regulates Longevity in Arabidopsis. *Plant Cell*, 24:482-506. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.090894>
- Wu, L.; Zhang, Z.; Zhang, H.; Wang, X. C.; Huang, R. (2008). Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing. *Plant Physiol.*, 148:1953-1963. <https://doi.org/10.1104/pp.108.126813>
- Yabuta, Y.; Mieda, T.; Rapolu, M.; Nakamura, A.; Motoki, T.; Maruta, T.; Yoshimura, K.; Ishikawa, T.; Shigeoka, S. (2007). Light regulation of ascorbate biosynthesis is dependent on the photosynthetic electron transport chain but independent of sugars in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.*, 58:2661-2671. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm124>
- Yokotani, N.; Nakano, R.; Imanishi, S.; Nagata, M.; Inaba, A.; Kubo, Y. (2009). Ripening-associated ethylene biosynthesis in tomato fruit is autocatalytically and developmentally regulated. *J. Exp. Bot.*, 60(12):3433-3442 <https://doi.org/10.1093/jxb/erp185>
- Yordanov, I.; Veleikova, V. (2000). Photoinhibition of photosystem I. *Bulg. J. Plant Physiol.* 26(1-2), 70-92.
- Yoshida, K.; Hara, A.; Sugiura, K.; Fukaya, Y.; Hisabori, T. (2018). Thioredoxin-like2/2-Cys peroxiredoxin redox cascade supports oxidative thiol modulation in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115:E8296–E8304. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808284115>
- Yoshida, S.; Tamaoka, M.; Ioki, M.; Ogawa, D.; Sato, Y.; Aono, M.; Kubo, A.; Saji, S.; Saji, H.; Satoh, S.; Nakajima, N. (2009). Ethylene and salicylic acid control glutathione biosynthesis in ozone-exposed Arabidopsis thaliana. *Physiol. Plant.*, 136:284-298. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01220.x>
- Zeng, J.; Dong, Z.; Wu, H.; Tian, Z.; Zhao, Z. (2017). Redox regulation of plant stem cell fate. *Embo. J.*, 36:2844-2855. <https://doi.org/10.15252/embj.201695955>
- Zhang, C.; Ouyang, B.; Yang, C.; Zhang, X.; Liu, H.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Li, H.; Ye, Z. (2013) Reducing AsA leads to leaf lesion and defense response in knock-down of the AsA biosynthetic enzyme GDP-D-Mannose pyrophosphorylase gene in tomato plant. *PLoS ONE*, 8(4): e61987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061987>

BIBLIOGRAFÍA

- Zhang, M.; Bing, Y.; Ping, L. (2009). The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *J. Exp. Bot.*, 60(6):1579–1588. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp026>
- Zhang, H.; Huang, L.; Dai, Y.; Liu, S.; Hong, Y.; Tian, L.; Huang, L.; Cao, Z.; Li, D.; Song, F. (2015). Arabidopsis AtERF15 positively regulates immunity against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and *Botrytis cinerea*. *Front. Plant Sci.*, 6:686. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00686>
- Zhou, M.; Diwu, Z.; Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P. (1997). A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal. Biochem.*, 253:162-168. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2391>