



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO Instituto Tecnológico de Veracruz

CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO POR FRÍO EN TOMATE (*Solanum lycopersicum L.*) GENÉTICAMENTE MODIFICADO

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

IBQ. Reyna Angélica Cruz Cortés

Asesores:

M.C. Javier De La Cruz Medina

Dra. Elizabeth León García

Dr. Hugo Sergio García Galindo

RESUMEN

Cruz Cortés, Reyna Angélica. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Febrero 2019. **CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO POR FRÍO EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) GENÉTICAMENTE MODIFICADO**. Asesores: M.C. Javier de la Cruz Medina, Dra. Elizabeth León García y Dr. Hugo Sergio García Galindo.

El tomate es un cultivo de alta importancia comercial, estos frutos sufren pérdidas post-cosecha debido a alteraciones fisiológicas, físicas y patológicas, que varían de acuerdo al área de producción, manipulación, distribución y el tiempo transcurrido entre cosecha y consumo. El daño por frío es un desorden fisiológico que provoca características indeseables resultantes del almacenamiento por debajo de 12 °C.

Se ha reportado que pretratamientos térmicos provocan cambios en la composición lipídica de las membranas; de manera similar, la aplicación de fito-hormonas que disminuyen la actividad de enzimas que participan en la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, como las lipoxigenasas (LOX) o fosfolipasas (PL), reducen los efectos del daño por frío.

El tomate *Solanum lycopersicum* var. TA234 con silenciamiento del gen *TomloxB*, principal isoforma del gen en frutos que codifica para LOX, expresa una menor actividad de esta enzima responsable de la oxidación de ácidos linoleico y linolénico, los cuales juegan un papel importante en la integridad de las membranas, provocan la acumulación de estos ácidos grasos, y confieren resistencia a bajas temperaturas. Sin embargo, no hay reportes de estudios que evalúen el daño por frío en frutos que tengan silenciado algún gen de lipoxigenasa.

Se espera que frutos con esta modificación genética sufran menor daño que frutos silvestres, por lo que en el presente proyecto se realizó una evaluación del daño por frío en tres líneas genéticamente modificadas, 6A, 1I y 6H a dos temperaturas de almacenamiento, 7 y 11 °C, durante 8 días, comparando con frutos sin modificar.

Se dio seguimiento a pérdida de peso, desarrollo del color, cambios en acidez y pH, contenido de sólidos solubles, actividad de LOX por espectrofotometría, respiración (producción de etileno y CO₂) y cuantificación de ácidos grasos por cromatografía de gases.

Las líneas 1I y, particularmente, 6H, manifestaron mejores resultados y con menor desviación que 6A, línea que no tuvo diferencia significativa con la línea testigo, a pesar de tener una actividad de LOX menor, y que al mismo tiempo fue, de las tres evaluadas en el presente trabajo, la línea genéticamente modificada con mayor actividad de la enzima en ambos tratamientos, por lo que se puede afirmar que los frutos con silenciamiento del gen *TomloxB* al tener mayor cantidad de C18:2 y C18:3 expresan, como consecuencia, retraso en la maduración, retraso en la senescencia y mayor resistencia al daño por frío que frutos sin modificación.

Los frutos de la línea 6H se mantuvieron en mejores condiciones en los dos tratamientos (7 y 11 °C) ya que no manifestaron síntomas de daño por frío, mientras que los testigos presentaron entre 30 y 50 por ciento más deterioro.

ABSTRACT

Cruz Cortés, Reyna Angélica. Master of Science in Biochemical Engineering. Food Research and Development Unit. Technological Institute of Veracruz. February 2019.

CHARACTERIZATION OF CHILLING INJURY IN TOMATO FRUIT (*Solanum lycopersicum* L.) GENETICALLY MODIFIED. Advisors: M.Sc. Javier de la Cruz Medina, PhD. Elizabeth León García and PhD. Hugo Sergio García Galindo.

The tomato is a crop of high commercial importance, these fruits suffer post-harvest losses due to physiological, physical and pathological alterations, which vary according to the area of production, handling, distribution and the time elapsed between harvest and consumption. Chilling injury is a physiological disorder that causes undesirable characteristics resulting from storage below 12 °C.

It has been reported that thermal pretreatments cause changes in the lipid composition of the membranes; similarly, the application of phyto-hormones that decrease the activity of enzymes that participate in the oxidation of polyunsaturated degrees of acid, such as lipoxygenases (LOX) or phospholipases (PL), reduce the effects of chilling injury.

The tomato *Solanum lycopersicum* var. TA234 with silencing of the *TomloxB* gene, the main isoform of the gene in fruits that codes for LOX, expresses a lower activity of this enzyme responsible for the oxidation of linoleic and linolenic acids, which play an important role in the integrity of the membranes, cause accumulation of these fatty acids, and confer resistance at low temperatures. However, there are no reports of studies evaluating chilling injury in fruits that have a lipoxygenase gene silenced.

It is expected that fruits with this genetic modification suffer less damage than wild fruits, so in the present project an evaluation of the damage by cold was carried out in three genetically modified lines, 6A, 1I and 6H at two storage temperatures, 7 and 11 °C, for 8 days, comparing with fruits without modifying.

Weight loss, color development, changes in acidity and pH, content of soluble solids, LOX activity by spectrophotometry, respiration (production of ethylene and CO₂) and quantification of fatty acids by gas chromatography were followed.

Lines 1I and, particularly, 6H, showed better results and with less deviation than 6A, line that did not have significant difference with the control line, despite having a lower LOX activity, and at the same time it was, of the three evaluated in the present work, the genetically modified line with greater activity of the enzyme in both treatments, so it can be affirmed that the fruits with silencing of the *TomloxB* gene having a higher quantity of C18: 2 and C18: 3 express, as a consequence, delay in ripening, delay in senescence and greater resistance to chilling injury than fruits without modification.

The fruits of the 6H line were maintained in better conditions in the two treatments (7 and 11 °C) since they did not show symptoms of chilling injury, while the controls presented between 30 and 50 per cent more deterioration.

Contenido

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 11 |
| 2. ANTECEDENTES | 13 |
| 2.1. Origen, domesticación y difusión. | 13 |
| 2.2. Época de producción | 14 |
| 2.3. Taxonomía | 14 |
| 2.4. Descripción botánica <i>Solanum lycopersicum</i> | 15 |
| 2.5. Grado de madurez | 17 |
| 2.6. Composición nutricional | 19 |
| 2.7. Requerimientos de clima y suelo | 20 |
| 2.7.1. Clima | 20 |
| 2.7.2. Suelo | 20 |
| 2.8. Requerimientos nutricionales del cultivo..... | 21 |
| 2.9. Manejo de la temperatura. | 21 |
| 2.10. Cadena de distribución | 21 |
| 2.11. Tipos de daño | 22 |
| 2.12. Almacenamiento | 23 |
| 2.13. Comercialización | 24 |
| 2.14. Daño por frío | 25 |
| 2.15. Lipoxigenasas | 25 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 27 |
| 4. HIPÓTESIS | 27 |
| 5. OBJETIVOS | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1. General | 28 |
| 5.2. Específicos..... | 28 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 29 |
| 6.1. Material vegetal y obtención de frutos | 29 |
| 6.2. Tratamiento: almacenamiento a bajas temperaturas..... | 29 |
| 6.3. Protocolo de bioseguridad | 29 |
| 6.4. Variables de respuesta | 30 |
| 6.4.1. Firmeza..... | 30 |
| 6.4.2. Acidez titulable | 30 |
| 6.4.3. Valor de pH..... | 30 |
| 6.4.4. Color | 30 |
| 6.4.5. Sólidos solubles..... | 31 |
| 6.4.6. Pérdida de peso | 31 |
| 6.4.7. Velocidad de producción de etileno (VPE) y producción de CO ₂ | 31 |
| 6.4.8. Actividad de Lipoxigenasa | 32 |
| 6.4.9. Determinación de ácidos grasos | 33 |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 35 |
| 7.1. Confirmación de la transformación | 37 |
| 7.2. Evolución de color..... | 38 |
| 7.3. Firmeza | 42 |
| 7.4. Actividad de LOX | 43 |
| 7.5. Contenido de ácido linoleico y linolénico. | 44 |
| 7.6. Producción de etileno y CO ₂ | 46 |
| 7.7. Contenido de sólidos solubles. | 48 |

| | |
|-----------------------------|-----------|
| 7.8. pH y acidez | 49 |
| 7.9. Pérdida de peso..... | 50 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA..... | 53 |
| 10. ANEXOS | 57 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Clasificación botánica de tomate (<i>Solanum Lycopersicum</i>)..... | 15 |
| Tabla 2. Composición del tomate..... | 19 |
| Tabla 3. Requerimientos nutricionales..... | 21 |
| Tabla 4. Clasificación y severidad de los principales defectos en tomate. | 22 |
| Tabla 5. Temperatura óptima de almacenamiento de acuerdo con el grado de madurez. | 24 |
| Tabla 6. Condiciones de la PCR..... | 38 |
| Tabla 7. Relación del contenido de C18:2 entre tratamientos..... | 46 |
| Tabla 8. Relación del contenido en por ciento de C18:3 entre tratamientos..... | 46 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Etapas fenológicas del tomate. | 16 |
| Figura 2. Partes que conforman el tomate. | 17 |
| Figura 3. Carta de clasificación del color en Tomate del Departamento de Agricultura de Estados Unidos. | 18 |
| Figura 4. Diagrama de color según la escala CIE (L*a*b*). | 31 |
| Figura 5. Apariencia de los frutos almacenados a 7 °C en cada punto de muestreo. | 36 |
| Figura 6. Apariencia de los frutos almacenados a 11 °C en cada punto de muestreo. | 37 |
| Figura 7. Gel de electroforesis de PCR: banda del gen <i>UIDA</i> 987 pb. | 38 |
| Figura 8. Cambio de °Hue en color externo. | 39 |
| Figura 9. Apariencia de frutos de cada línea en D0 y D9 almacenados a 7 y 11 °C. | 40 |
| Figura 10. Seguimiento de croma en color externo. | 41 |
| Figura 11. Cambio de luminosidad en color externo. | 42 |
| Figura 12. Pérdida de firmeza. | 43 |
| Figura 13. Actividad de la LOX. | 44 |
| Figura 14. Contenido de ácido linoleico (C18:2). | 45 |
| Figura 15. Contenido de ácido linolénico (C18:3). | 45 |
| Figura 16. Producción de etileno. | 47 |
| Figura 17. Producción de CO ₂ | 48 |
| Figura 18. Evolución del contenido de sólidos solubles. | 49 |
| Figura 19. Cambio de pH. | 50 |
| Figura 20. Contenido de acidez como ácido cítrico. | 50 |
| Figura 21. Pérdida de peso. | 51 |

1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es de suma importancia para México ya que es el principal fruto de hortaliza de comercio internacional y representa el mayor volumen de producción para esta área. En 2015, México fue el mayor exportador de tomate a nivel mundial, siendo Estados Unidos, Japón y Canadá los principales mercados de importación. La exportación de tomate representa el 14.68 % de las exportaciones agropecuarias nacionales, es el principal cultivo de agricultura protegida y el consumo per cápita en el país es de 13.8 kg (SAGARPA, 2016) siendo el producto de hortalizas de mayor importancia de país. Los frutos de tomate se consumen tanto frescos como procesados y contienen compuestos importantes para la salud humana como licopeno y β -caroteno, antioxidantes que contrarrestan los efectos de radicales libres los cuales están involucrados en el desarrollo de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como el cáncer.

En los últimos años, uno de los principales objetivos en los cultivos hortofrutícolas ha sido mejorar los atributos de calidad a través del control de la maduración. Se ha buscado disminuir las pérdidas postcosecha debidas a diversos factores como el daño físico o mecánico propiciado en el fruto debido al maduramiento excesivo. De esta manera, se busca aumentar sus oportunidades de mercadeo en su periodo postcosecha. Uno de los principales problemas que enfrentan los sectores de producción y comercio agrícola son las pérdidas postcosecha, las cuales son consecuencia de alteraciones fisiológicas, físicas y patológicas. La magnitud de estas pérdidas varía en gran medida de acuerdo con el área de producción, la manipulación, el sistema de distribución y el tiempo transcurrido durante la cadena de producción del cultivo y consumo.

Estas pérdidas son ocasionadas por desórdenes fisiológicos, daño mecánico durante cosecha y transporte, y por problemas patógenos. Dentro de los desórdenes fisiológicos se encuentra el daño por frío, el cual se produce principalmente en la membrana celular

con cambios en la composición de fosfolípidos propiciado por bajas temperaturas de almacenamiento.

Con el fin de incrementar la vida de anaquel de los frutos y así disminuir las pérdidas postcosecha, se han realizado investigaciones sobre organismos genéticamente modificados. El presente trabajo se enfoca en examinar los efectos del daño por frío en frutos de tomate *Solanum lycopersicum* var. TA234 con silenciamiento del gen *TomloxB* principal isoforma de LOX expresada en frutos. Como parte de la evaluación se dará seguimiento a pérdida de peso, desarrollo del color, cambios en acidez y pH, contenido de sólidos solubles, actividad de LOX por espectrofotometría, productos de respiración (etileno y CO₂) y cuantificación de ácidos grasos por cromatografía de gases.

El enfoque de los estudios previos ha sido encontrar las mejores condiciones de almacenamiento para evitar temperaturas de daño por frío y disminuir pérdidas post-cosecha. Se ha reportado que pre-tratamientos con calor provocan cambios en la composición lipídica de las membranas o aplicación de fito-hormonas, provocando la disminución en la actividad de las enzimas que participan en la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, como las lipoxigenasas (LOX) o fosfolipasas (PL), reduciendo los efectos del daño por frío. En el laboratorio de post-cosecha, se cuenta con tomate *Solanum lycopersicum* var. TA234 con silenciamiento del gen *TomloxB*, principal isoforma de LOX expresada en frutos, que presentan una menor actividad de esta enzima que es responsable de la oxidación de ácidos linoleico y linolénico, los cuales juegan un papel importante en la integridad de las membranas. Esto provoca una acumulación de estos ácidos grasos, los cuales confieren resistencia a bajas temperaturas. Sin embargo, no hay reportes de estudios que evalúen el daño por frío en frutos que tengan silenciado algún gen de lipoxigenasa.

2. ANTECEDENTES

2.1. Origen, domesticación y difusión.

El origen del género *Lycopersicum* se localiza en la región andina que se extiende desde el sur de Colombia al norte de Chile, y parte de Perú, Bolivia y Ecuador (Dorais *et al.*, 2008). Sin embargo, parece que fue en México donde el tomate se domesticó, pues desde antes de la llegada de los españoles el tomate se encontraba como hierba común entre las milpas (Dorais *et al.*, 2008; Labate *et al.*, 2007). Durante el siglo XVI los aztecas cultivaban, vendían y consumían integralmente al tomate, el cual podía ser de distintas formas y tamaños, e incluso rojos y amarillos. El tomate fue llevado a España y después al resto de Europa. El primer registro en el viejo mundo del tomate se tiene en 1544 en Italia hecha por Matthioli, quien describió un fruto amarillo bajo el nombre de *pome d'oro*. (Dorais *et al.*, 2008; Labate *et al.*, 2007). Al final del siglo XVIII el tomate empezó a ser sembrado y consumido en abundancia en Italia y en la península Ibérica. Los españoles y portugueses difundieron el tomate a Oriente medio y África al final del siglo XVI, especialmente en Egipto y Túnez. Posteriormente, el comercio turco lo llevó a la cuenca del Mediterráneo y al noreste; y, por otro lado, el comercio portugués de especias lo llevaron a Mozambique y Angola (Labate *et al.*, 2007). La introducción del tomate en Asia fue probablemente llevada a cabo desde las Filipinas, a través de los galeones españoles. Este comercio se dio en dichas islas y también en países cercanos como China, Japón y la India, y estos últimos contribuyeron posiblemente a su difusión al resto del continente (Dorais *et al.*, 2008). El comercio portugués de esclavos también contribuyó a su difusión. La introducción del tomate en Norteamérica se dio más tarde, con la llegada de los europeos quienes ya lo tenían domesticado. El primer registro que se tiene del tomate en Norteamérica, se dio en San Diego, California en 1850 (Dorais *et al.*, 2008).

La domesticación y cultivo del tomate fuera de su centro de origen parece que tuvo lugar inicialmente con las primeras civilizaciones de México. Precisamente, la palabra tomate proviene del vocablo náhuatl "tomatl"; en 1554 fue llevado a Europa, empezando a comercializarse en Estados Unidos hacia el año 1835, cuando el tomate comenzó a adquirir popularidad que lo ha hecho un alimento muy consumido hasta

nuestros días. Todavía puede encontrarse una gran diversidad de formas cultivadas de tomate en los primeros centros de domesticación (Frankenberger *et al.*, 1981).

2.2. Época de producción

La época de producción de tomate se realiza durante todo el año, con algunas restricciones o limitaciones en invierno (Cultivos a campo abierto) sobre todo en zonas con altas probabilidades de heladas. En primavera - verano demuestra todo su potencial y donde se presenta las mayores ocurrencias de plagas y enfermedades (FAO, 2013).

2.3. Taxonomía

La familia Solanaceae consiste en 96 géneros y más de 2800 especies en tres subfamilias, Solanoideae, Cestroideae y Solanineae. Solanaceae es una de las familias económicas más importantes de las angiospermas y que contiene muchas de las plantas cultivadas como el tomate, papa, chile, berenjena, petunia, y el tabaco. La familia Solanaceae es la más variable de todas las especies de los cultivos en términos de utilidad agrícola, es la tercera familia de especies de los cultivos en términos de utilidad agrícola, es la tercera familia de los cultivos de mayor importancia económica, superada solo por las gramíneas y leguminosas, y la más valiosa en términos de cultivos hortícolas. Entre todas las familias de plantas, los miembros de las solanáceas son muy diversos en términos de hábito de crecimiento (desde árboles a pequeñas hierbas anuales), hábitat (desde los desiertos hasta el bosque húmedo tropical), y la morfología. Muchas especies de solanáceas han jugado papeles importantes como plantas modelo (Foolad *et al.*, 2007). El tomate común es una planta dicotiledónea que se encuadra en la familia de las solanáceas. En la tabla 1, se muestra la ubicación taxonómica actualmente más aceptada del tomate.

Tabla 1. Clasificación botánica de tomate (*Solanum Lycopersicum*).

| | |
|-------------|------------------------|
| Reino | Plantae |
| Subreino | Embryobionta |
| División | Magnoliophyta |
| Subdivisión | Angiosperamae |
| Clase | Magnoliopsida |
| Subclase | Dicotyledonae |
| Orden | Tubiflorae |
| Familia | Solanaceae |
| Subfamilia | Solanoideae |
| Tribu | Solanacea |
| Genero | Solanum = Lycopersicum |
| Especie | S. lycopersicum |

(Foolad *et al.*, 2007)

2.4. Descripción botánica *Solanum lycopersicum*.

El tomate se clasifica como un cultivo hortícola herbáceo de ambientes cálidos, con temperatura óptima de crecimiento de 20 a 25 °C. Su crecimiento y desarrollo se detiene a temperaturas inferiores a 10 °C. Las formas cultivadas del tomate son diploides, autogamas, herbáceas, perennes y semiperennes en regiones tropicales, y se utilizan como cultivo anual casi universalmente. En condiciones de crecimiento adecuadas, su sistema radial fibroso y robusto, pudiendo llegar a 1.2 a 1.8 m de profundidad. Los tallos son cilíndricos en plantas jóvenes y angulosos en plantas

maduras; alcanzan alturas de 0.4 a 2 m. En la Figura 1 se muestran las etapas de crecimiento de las plantas de tomate.

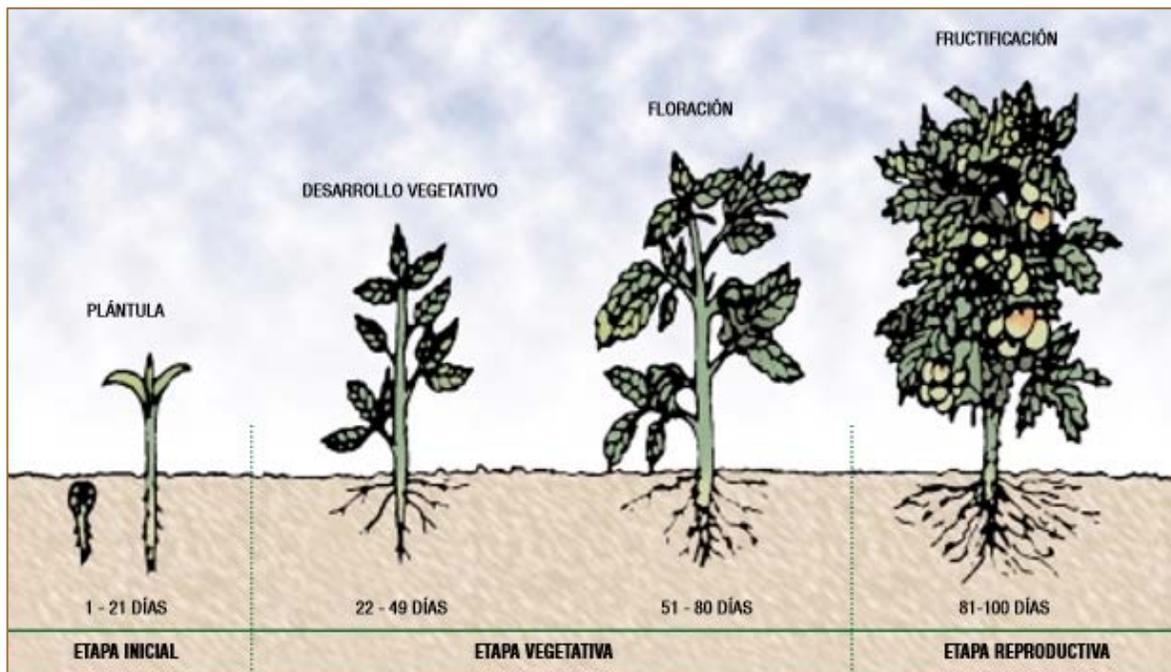


Figura 1. Etapas fenológicas del tomate.

Los frutos de tomate están por formados por tres divisiones, las semillas, el pericarpio y el tejido placentario, en la figura 2 se muestran las partes que los conforman, tanto externa como internamente.

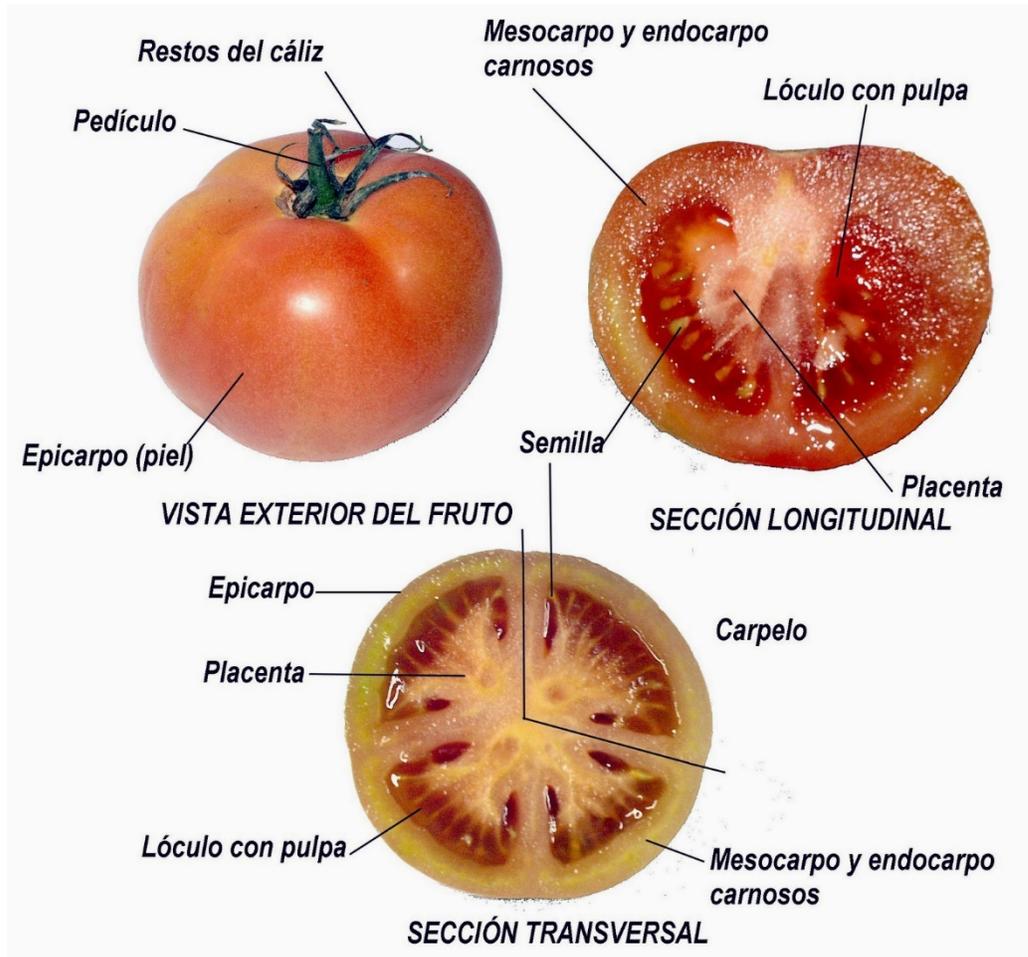


Figura 2. Partes que conforman el tomate.

2.5. Grado de madurez

Según la carta del color de tomate recomendado por el departamento de Agricultura de Estados Unidos (figura 3), los frutos de tomate se clasifican en seis estados de madurez. En el estado *Green* se encuentran completamente verdes, en *Breaker* se aprecia un rompimiento del color verde a amarillo, rosado o rojo en no más del 10 % de la superficie del fruto. En el estado *Turning* existe entre el 10 y el 30 % el cambio definido de color verde al amarillo, rosa o rojo. El estado *Pink* muestra entre el 30 y el 60 % de la superficie del fruto de color rosa o rojo. En el estado *Light Red* más del 60 % de la superficie del fruto muestra un color rosado-rojo o rojo, pero no más del 90 %. En el estado *Red*, más del 90 % de la superficie es de color rojo.

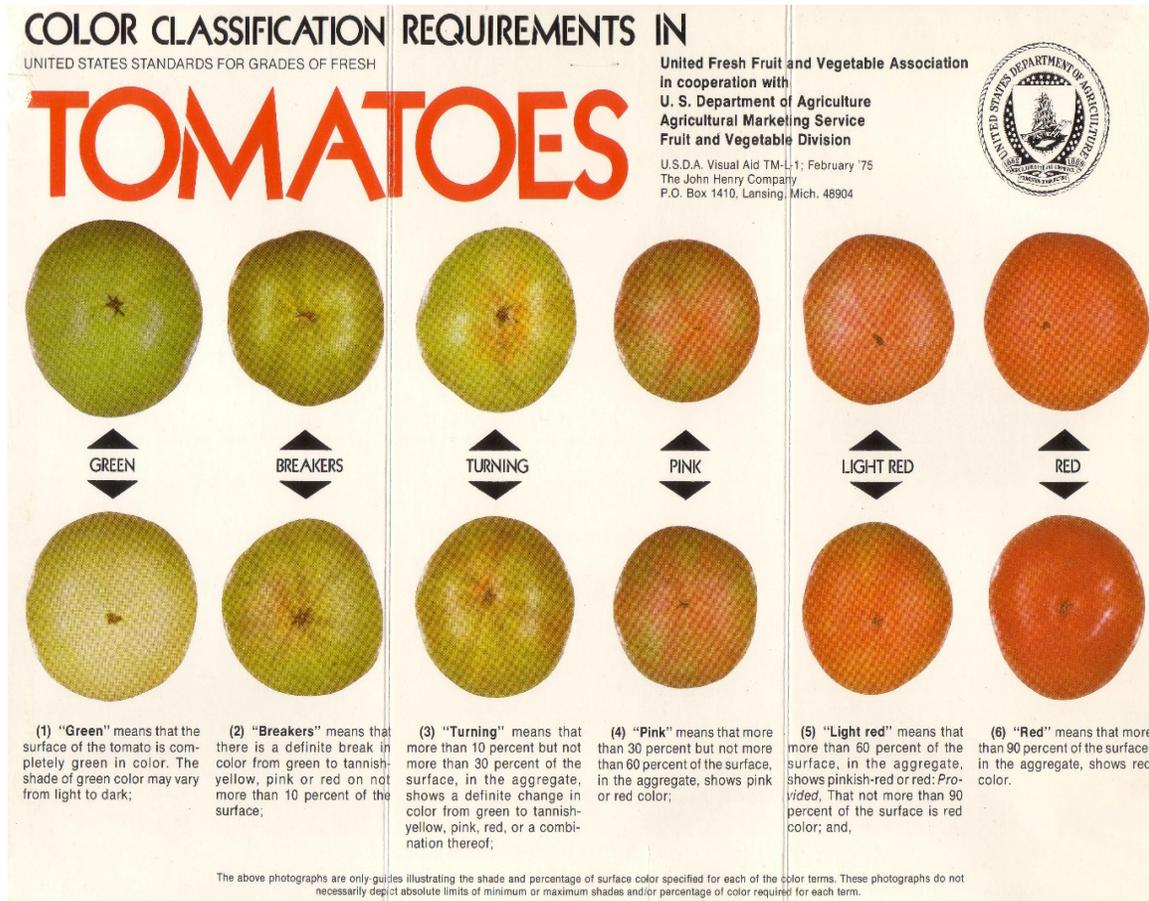


Figura 3. Carta de clasificación del color en Tomate del Departamento de Agricultura de Estados Unidos.

De acuerdo con los estándares de BANCOMEXT, los frutos de tomate se clasifican de acuerdo con su grado de madurez y color:

- Grado de madurez 1: color verde (*Green*).
- Grado de madurez 2: color quebrando (*Breaker*).
- Grado de madurez 3: color rayando (*Turning*).
- Grado de madurez 4: color rosa (*Pink*).
- Grado de madurez 5: color rojo claro (*Light Red*).
- Grado de madurez 6: color rojo (*Red*).

Correspondientes a la clasificación de la figura 3.

2.6. Composición nutricional

El tomate está compuesto principalmente por agua y su macronutriente mayoritario son los hidratos de carbono. Entre las vitaminas cabe destacar el contenido en vitamina A, básicamente en forma de carotenoides provitamina A y vitamina C. Una ración de tomate cubre el 61% de las ingestas recomendadas de vitamina C para la población de estudio. En la tabla 2 se muestra la composición general de 100 gramos de tomate.

Tabla 2. Composición del tomate.

| Compuesto | Cantidad | Compuesto | Cantidad |
|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| Calorías | 21 kcal | Hierro | 0.7 mg |
| Agua | 94.3 g | Magnesio | 10 mg |
| Carbohidratos | 3.3 g | Zinc | 0.1 mg |
| Grasas | 0.1 g | Vitamina A | 82.3 µg |
| Proteínas | 0.9 g | Vitamina E | 1.2 mg |
| Fibra | 0.8 g | Vitamina C | 26 mg |
| Cenizas | 0.6 g | Vitamina B6 | 0.11 mg |
| Sodio | 9 mg | Tiamina | 0.06 mg |
| Potasio | 290 mg | Riboflavina | 0.04 mg |
| Calcio | 7 mg | Niacina | 0.8 mg |
| Fósforo | 19 mg | Ácido cítrico | 20 mg |

(FAO, 2012)

2.7. Requerimientos de clima y suelo

2.7.1. Clima

El tomate es una especie de estación cálida razonablemente resistente al calor y a la sequía y sensible a las heladas. Es menos exigente en temperatura que la berenjena y el pimiento, aunque se produce en una amplia gama de condiciones de clima y suelo, prospera mejor en climas secos con temperaturas moderadas. La humedad relativa óptima para el desarrollo del tomate varía entre un 60 % y un 80 %. Las humedades relativas muy elevadas favorecen el desarrollo de enfermedades aéreas y el agrietamiento del fruto y dificultan la fecundación, debido a que el polen se compacta, abortando parte de las flores. Por otro lado, la humedad relativa demasiado baja dificulta la fijación del polen al estigma de la flor. Las temperaturas sobre los 30 °C afectan la fructificación. Asimismo, la temperatura nocturna puede ser determinante en la cuaja, pues debe ser suficientemente fresca (15 a 22 °C). Las temperaturas inferiores a 12-15 °C también originan problemas en el desarrollo de la planta y pueden provocar frutos deformes. En general, con temperaturas superiores a 25 °C e inferiores a 12 °C la fecundación es defectuosa o nula. La maduración del fruto está muy influida por la temperatura en lo referente tanto a la precocidad como a la coloración, de forma que valores cercanos a los 10 °C, así como superiores a los 30 °C originan tonalidades amarillentas. La planta detiene su crecimiento a temperaturas entre los 10 °C y 12 °C y se hiela a -2 °C.

2.7.2. Suelo

Aunque el tomate puede producirse en una amplia gama de condiciones de suelos, los mejores resultados se obtienen en suelos profundos (1 m o más), de texturas medias, permeables y sin impedimentos físicos en el perfil. Los suelos con temperaturas entre los 15 y 25 °C favorecen un óptimo establecimiento del cultivo después del trasplante. El pH debe estar entre 6.2 a 6.8.

2.8. Requerimientos nutricionales del cultivo

Dependiendo de la variedad de tomate a sembrar y del tipo de manejo, así serán las demandas nutricionales; sin embargo, en forma general, los requerimientos nutricionales del cultivo, en kg/ha, se muestran a continuación.

Tabla 3. Requerimientos nutricionales.

| Elemento | Nitrógeno | Fósforo | Potasio | Calcio | Magnesio | Azufre |
|-----------------|------------------|----------------|----------------|---------------|-----------------|---------------|
| kg/ha | 150 | 200 | 275 | 150 | 25 | 22 |

(SAGARPA, 2016)

El orden de extracción de nutrientes por la planta de tomate en forma decreciente es K, N, Ca, S, Mg y P.

2.9. Manejo de la temperatura.

Un buen manejo de la temperatura controla efectivamente el proceso de maduración de los tomates maduros. Los tomates son susceptibles al daño por frío a temperaturas de almacenamiento por debajo de 13 °C. El daño por frío es acumulativo y su severidad depende del estado de madurez del fruto, temperatura y la duración del almacenamiento. Bajo temperaturas que causan daño por frío, el tomate desarrolla un color pobre, bajo sabor y aumento de las pudriciones.

2.10. Cadena de distribución

La capacidad para llegar al mercado de destino con frutos de alta calidad requiere de la atención en detalle de las operaciones desde las prácticas culturales en el campo hasta que el fruto es consumido. La protección y cuidado de los frutos es fundamental, tanto en la producción y cosecha como en el manejo postcosecha con el propósito de evitar las causas inmediatas del deterioro (golpes, heridas, suciedad, etc.) y disminuir aquellas que pueden ocurrir después en los canales de distribución.

2.11. Tipos de daño

En la tabla 4 se describe la clasificación y severidad de los principales defectos en tomates.

Tabla 4. Clasificación y severidad de los principales defectos en tomate.

| DAÑO | DAÑO SEVERO | DAÑO MUY SEVERO |
|--|---|--|
| Rajaduras (diferentes a cara de gato), daño mecánico, granizo, etc. | | |
| No profundas y hasta 10 mm de diámetro acumulado. | No profundas y hasta 16 mm de diámetro acumulado. | No profundas y hasta 25 mm de diámetro acumulado. |
| Rajaduras de crecimiento (radiales desde o concéntricas al pedúnculo). | | |
| No más de 3 mm de profundidad. Individuales, hasta 13 mm de largo. Acumuladas, hasta 25 mm de largo. | No más de 3 mm de profundidad. Individuales, hasta 19 mm de largo. Acumuladas, hasta 44 mm de largo. | No más de 6 mm de profundidad. Individuales, hasta 25 mm de largo. Acumuladas, hasta 73 mm de largo. |
| Decoloración interna (mancha café). | | |
| Hasta 13 mm de diámetro acumulado. | Hasta 25 mm de diámetro acumulado. | Más de 32 mm de diámetro acumulado. |
| Estrías | | |
| Cualquier cantidad aparente. | Hasta 16 mm del área. | Hasta 25 mm del área. |
| Áreas hundidas | | |
| Cualquier cantidad que afecte la apariencia. | Cualquier cantidad que afecte seriamente la apariencia. | Cualquier cantidad que afecte muy seriamente la apariencia. |
| Bofos | | |
| Espacio abierto en uno o más lóculos que afecte la apariencia del fruto en corte transversal. | Espacio abierto en uno o más lóculos que afecte seriamente la apariencia del fruto en el corte transversal. | Espacio abierto en dos o más lóculos que afecte muy seriamente la apariencia del fruto en corte transversal. |

Continuación Tabla 4.

| DAÑO | DAÑO SEVERO | DAÑO MUY SEVERO |
|---|---|---|
| Cortaduras o heridas abiertas | | |
| Individuales, hasta 13 mm de largo. Acumuladas, hasta 10 mm de diámetro. | Individuales, hasta 13 mm de largo. Acumuladas, hasta 13 mm de diámetro. | Heridas frescas o cicatrizadas que se extienden a través de la pared del fruto. |
| Cara de gato | | |
| Hasta 13 mm de diámetro acumulado. | Hasta 19 mm de diámetro acumulado. | Más de 25 mm de diámetro acumulado. |

NOTA: Estas medidas están basada en tomates de 64 mm de diámetro. Si el tomate es más grande, el daño permitido será mayor y viceversa.

(SAGARPA, 2005).

2.12. Almacenamiento

El rango de temperatura en el cuarto de almacenamiento o durante el transporte dependerá del estado de madurez del fruto (tabla 5). Mantener la humedad relativa del aire en el almacenamiento entre el 90 y 95 % para prevenir la deshidratación del fruto y especialmente el cáliz en frutos que lo presenten.

Tabla 5. Temperatura óptima de almacenamiento de acuerdo con el grado de madurez.

| Grado de madurez | Temperatura (°C) |
|-------------------------|-------------------------|
| 1 | 13-15 por 14 días |
| 2 | 10-12 |
| 3 | 10-12 |
| 4 | 9-10 |
| 5 | 9-10 |
| 6 | 7-10 por 3-5 días |

(SAGARPA, 2005).

Los tomates son sensibles a sufrir daño por frío cuando se almacenan a 10 °C por 2 semanas, o a 5 °C por una semana. (SAGARPA, 2005). Sin embargo, para fines de investigación, varios autores establecen que los frutos de tomate sufren daño por frío cuando son almacenados a temperaturas inferiores a 12 °C. (Lyons y Raison, 1970; Thorne y Efiuvwevwere, 1988; Lurie *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2016)

2.13. Comercialización

La comercialización ordenada de las mercancías perecederas a menudo requiere de algún almacenamiento. De esta forma se controlan las fluctuaciones entre el producto cosechado y las ventas; para algunos productos se utiliza el almacenamiento a largo plazo para prolongar la comercialización más allá del término de la cosecha. Los objetivos del almacenamiento son:

- Disminuir la actividad biológica del producto mediante el mantenimiento de la temperatura más baja que no le cause daño por congelación o por frío.
- Disminuir el crecimiento y la propagación de los microorganismos mediante el mantenimiento de las temperaturas bajas con una elevada humedad relativa.

- Reducir la pérdida de humedad del producto y el consecuente marchitamiento y arrugamiento por reducción de la diferencia de la temperatura entre el producto y el aire y el mantenimiento de la humedad alta en la cámara de almacenamiento.
- Reducir la susceptibilidad al daño por el gas etileno.

2.14. Daño por frío

Se produce principalmente en la membrana celular con cambios en la composición de fosfolípidos propiciado por bajas temperaturas (Lurie *et al.*, 1987). Cuando la disponibilidad de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) presentes en la membrana de las células del tomate incrementa debido al estrés ocasionado por cambios en la temperatura de almacenamiento, pueden ser degradados con mayor facilidad trayendo como resultado una pérdida en la integridad de la membrana de las células, lo cual provoca que la calidad de los frutos decaiga rápidamente, disminuyendo la vida de anaquel de los frutos y generando pérdidas para los productores, comerciantes y consumidores.

Algunos síntomas del daño por frío son:

- Maduración anormal
- Picaduras superficiales
- Ecurrimiento
- Pardeamiento

Los síntomas del daño por frío se hacen evidentes durante la maduración a temperatura ambiente después de haber almacenado los frutos por debajo de los 12 °C durante más de una semana (Lyons y Raison, 1970; Thorne y Efiuvwevwere, 1988; Lurie *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2016).

2.15. Lipoxigenasas

Las lipoxigenasas (LOX), listadas en la Enzyme Commission (EC.1.13.11.12), una gran familia de dioxigenasas de ácidos grasos que contienen hierro no hemo, que se pueden encontrar en plantas y animales (Brash, 1999), son importantes en el catabolismo de fosfolípidos, iniciando una cascada lipolítica en el deterioro de la

membrana durante la senescencia y el estrés teniendo como principal sustrato a los PUFA (Pinhero *et al.* 1998; Wang, 2001; Mao *et al.*, 2007).

Se conocen al menos, cinco isoformas de lipoxigenasas (TomloxA, TomloxB, TomloxC, TomloxD, and TomloxE) presentes en tomate (Chen *et al.*, 2004). Las enzimas LOX se pueden agrupar en dos tipos: 9-LOX, que forma específicamente 9-HPOs, y 13-LOX, que forma específicamente 13-HPOs. También hay dos tipos de HPL: 9-HPL y 13-HPL, dividiendo 9-HPO o 13-HPO y generando dos fragmentos C9 o un fragmento C6 y un fragmento C12, respectivamente (Hanataka, 1994).

3. JUSTIFICACIÓN

En el grupo de trabajo del Laboratorio Postcosecha se cuenta con líneas de tomate *Solanum lycopersicum L.* var TA234 modificado genéticamente con silenciamiento del gen *TomloxB* que manifestaron menor actividad de la enzima lipoxigenasa en comparación con frutos no modificados, así como un contenido mayor de ácidos grasos poliinsaturados linoleico y linolénico (C18:2 y C18:3), los cuales, al ser oxidados, favorecen la pérdida de integridad de la membrana celular. Por esto, se propone que la disminución de la degradación estos ácidos grasos debido a la baja actividad de lipoxigenasa pueden reducir los efectos del daño por frío en frutos almacenados a bajas temperaturas, al mantener por más tiempo la integridad de las membranas celulares, pudiendo extender su vida de anaquel y, por consiguiente, disminuir las pérdidas postcosecha ocasionadas por esta condición.

Además, no existen reportes de estudios que evalúen el daño por frío en frutos genéticamente modificados con silenciamiento de algún gen de lipoxigenasa, por lo que este trabajo aporta información de interés para continuar con la línea de investigación.

4. HIPÓTESIS

Frutos de tomate *Solanum lycopersicum L.* var TA234 modificado genéticamente con silenciamiento del gen *TomloxB* sufren menor daño por frío que frutos no modificados (silvestres).

5. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar el daño por frío en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) var. TA234 genéticamente modificados con silenciamiento del gen de *TomloxB*.

5.2. Específicos

- ❖ Evaluar el efecto en la fisiología de frutos de tomate genéticamente modificados almacenados a 11 y 7 °C, en comparación con frutos silvestres, durante su posterior maduración a temperatura ambiente.
- ❖ Evaluar el efecto en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de frutos genéticamente modificados almacenados a 11 y 7 °C en comparación con frutos silvestres, durante su maduración a temperatura ambiente.
- ❖ Evaluar el efecto en la actividad de la enzima lipoxigenasa en frutos genéticamente modificados almacenados a 11 y 7 °C en comparación con frutos silvestres, durante su maduración a temperatura ambiente.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material vegetal y obtención de frutos

Frutos de tomate utilizados para la experimentación fueron cosechados de líneas de plantas de tomate *Solanum lycopersicum* var. TA234 con silenciamiento del gen *TomloxB* (6A, 1I y 6H) y una línea silvestre (sin modificación genética) utilizada como testigo, las cuales fueron cultivadas en el invernadero del Laboratorio de Manejo Postcosecha de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA) ubicado en el Instituto Tecnológico de Veracruz, lugar en el que encuentran confinadas bajo acceso restringido.

6.2. Tratamiento: almacenamiento a bajas temperaturas

Los frutos de tomate (de las cuatro líneas) fueron sometidos a dos tratamientos de estrés por bajas temperaturas almacenándolos a 7 u 11 °C en cámaras de refrigeración durante 8 días para provocar los efectos del daño por frío, con una posterior maduración a temperatura ambiente (24 ± 1 °C). A este periodo de maduración se le denominó *almacenamiento post-frío*, durante el cual se realizaron análisis cada tres días a partir del día 0 (D0) hasta el día 9 (D9), teniendo cuatro puntos de muestreo (D0, D3, D6 y D9).

6.3. Protocolo de bioseguridad

Todo el material biológico genéticamente modificado (frutos, semillas, flores, etc.) fue esterilizado en autoclave a 121 °C y 1.5 atm durante 15 minutos antes de ser desechado por completo, para evitar la diseminación accidental del material genético por cruza con especies silvestres.

Los frutos de tomate fueron cosechados en el estado de maduración 2 (*break*) según la carta del color de tomate recomendado por el departamento de Agricultura de Estados Unidos (Figura 3).

6.4. Variables de respuesta

Se analizaron las siguientes variables de respuesta:

6.4.1. Firmeza

Se utilizó un medidor de la firmeza y dureza de la fruta (Fruit Texture Analyser) marca GÜSS, modelo FTA GS-25 (# de serie FTA2 920). Para frutos de, máximo, 12 cm de alto y un rango de operación de 50 gramos a 25 000 gramos, con una punta cónica de 8 mm.

6.4.2. Acidez titulable

El contenido de acidez se determinó como % de ácido cítrico por gramo de jugo de pulpa de los frutos. Se realizó por titulación con NaOH 0.1 N (Golden Bell[®]) de acuerdo con el método de AOAC (1990).

6.4.3. Valor de pH

Se realizó por medición directa, empleando un potenciómetro Science Med, Modelo 3 BW (Finlandia).

6.4.4. Color

Se determinó el °*Hue*, Luminosidad (L^*) y Cromo (C^*) en piel utilizando un colorímetro marca Hunter Lab, Modelo 4500L (Reston, Virginia, USA), que utiliza la escala CIE (L^*a^*b) (Figura 5) para el cálculo del color.

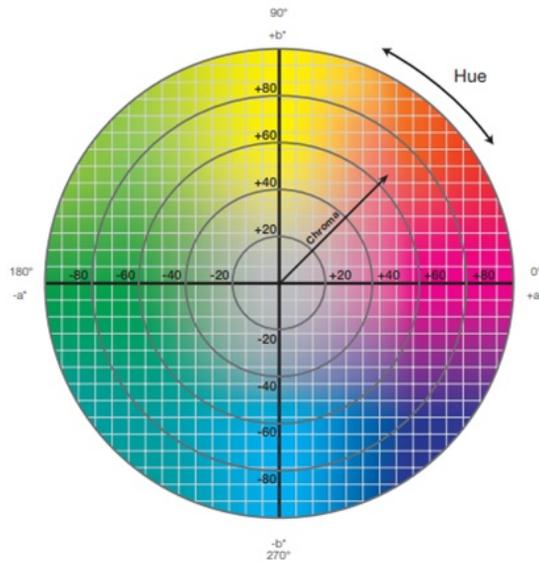


Figura 4. Diagrama de color según la escala CIE ($L^*a^*b^*$).

6.4.5. Sólidos solubles

Se determinó la cantidad de sólidos solubles del jugo extraído de la pulpa de los frutos mediante un refractómetro Leica Abbe Mark II digital (Buffalo, N.Y. USA). Los resultados obtenidos se reportaron como porcentaje de sólidos solubles a 20 °C (AOAC, 1990).

6.4.6. Pérdida de peso

El porcentaje de pérdida de peso se determinó por peso directo de cada uno de los frutos en una balanza electrónica marca Sartorius modelo BL 2100 (Alemania), según el método de la NMX-FF-014-1982.

6.4.7. Velocidad de producción de etileno (VPE) y producción de CO₂

Para cuantificar la producción de Etileno y CO₂ se pusieron a respirar individualmente 3 frutos de tomate en frascos de vidrio de 300 mL de capacidad, con tapa hermética acondicionada con un septo de goma, del cual se extraía después de 1 h de permanencia del fruto, 1 mL del espacio libre de cabeza y el gas producido se inyectó inmediatamente a un cromatógrafo de gases Agilent modelo 7820A. Se utilizó una

columna Poraplot Q (# serie USF480715B, USA) de 15 m de largo con un diámetro de 0.32 mm y un flujo de 7 mL/min. Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron: 100 °C en el horno, 150 °C en el inyector y 250 °C en ambos detectores, FID y TCD. Como gas acarreador se usó nitrógeno y para la ignición de flama hidrógeno y aire comprimido.

Las áreas bajo la curva obtenidas de las lecturas de los cromatogramas fueron analizadas mediante la siguiente fórmula propuesta por Salveit y Yang (1987):

$$TPE = \left(\frac{V_{gas}}{T} \right) \left(\frac{E_m - E_t}{P} \right)$$

Donde:

TPE = Tasa de producción de etileno en nL*kg⁻¹*h⁻¹

Vgas = Volumen de la cámara – volumen del fruto (mL)

T = Tiempo de residencia del fruto en la cámara (h)

Em = µg/L de etileno en la muestra

Et = µg/L de etileno en el testigo

P = Peso del fruto en kg

La misma fórmula se acondicionó para la cuantificación de CO₂

6.4.8. Actividad de Lipoxigenasa

Preparación del extracto:

Se maceró la pulpa de tomate y el jugo extraído se colocó en tubos eppendorf® de 1.5 mL de capacidad. A continuación, se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min, se recuperó el sobrenadante y se realizó una segunda centrifugación a 14000 rpm durante 3 min. El sobrenadante se filtró con discos de membrana Millipore® de 0.45 µm de diámetro de poro y se reservó para su posterior utilización.

Preparación de la solución sustrato (Técnica de Gökmen modificada).

Se colocaron 5 mL de buffer de fosfatos (ver anexo 1) en un vaso de precipitados de 30 mL y se añadieron 157.2 μ L de ácido linoleico al 60% (Sigma) y 157.2 μ L de Tween 80 (Sigma), llevando la mezcla a baño maría, agitando manualmente para la incorporación de los reactivos. Después se añadió 1 mL de NaOH 1 N (Golden Bell[®]) y se aforó a 100 mL con el mismo buffer de fosfatos. A partir de este momento se mantuvo en oscuridad.

Reacción:

La reacción se llevó a cabo en tubos de ensayo al agregar 40 μ L del extracto, 2.64 mL de la solución sustrato y 1360 μ L de buffer. Los tubos se mantuvieron en baño María a 37 °C durante 10 min. Pasado este tiempo la reacción se detuvo por medio de un baño de hielo. El blanco contenía solo el buffer y la solución sustrato. Las muestras se leyeron a 234 nm en un espectrofotómetro Agilent[®] modelo 8453 (China). La actividad de lipoxigenasa se definió como el incremento en la absorbancia de 0.001 * mg de proteína * min. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford.

6.4.9. Determinación de ácidos grasos

La determinación de ácidos grasos de los frutos se realizó en tres etapas: 1) extracción de los ácidos grasos del material vegetal, 2) derivatización alcalina de los ácidos grasos totales presentes en el material vegetal y 3) cuantificación por cromatografía de gases.

Para la primera etapa se siguió la técnica de Soto-Rodríguez (2008), con algunas modificaciones como a continuación se describen. Se maceró tejido sin semillas y se pesaron 3 g en balanza analítica Entris[®] modelo ENTRIS224-1S (Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Goettingen, Germany), posteriormente se procedió a agregar 6 mL de cloroformo, agitando en un agitador orbital Modelo MaxQ 4450 (Shaker) (Thermo Scientific[®], Marietta, OH) durante 10 minutos a 250 rpm; pasado este tiempo se agregaron 12 mL de metanol y nuevamente se agitó en Shaker por 10 min. Por último, se agregaron 6 mL más de cloroformo, nuevamente, con agitación orbital durante 10 minutos y se centrifugó a 5000 rpm por 10 min; después de

centrifugar se separó la fracción clorofórmica con pipetas Pasteur y se colocó en matraz de balón para ser evaporada en rotavapor, y se le agregaron 5 mL de hexano al matraz balón para recuperar los ácidos grasos extraídos. Por otro lado, se pesaron tubos limpios y secos, y se transfirió el aceite del matraz balón a estos tubos ya pesados, enseguida se evaporó el hexano con nitrógeno en campana de extracción de gases y se procedió a pesar nuevamente los tubos, ahora con el aceite, para conocer la cantidad de ácidos grasos extraídos de cada muestra.

En la segunda etapa, la derivatización de los ácidos grasos, se utilizaron los extractos obtenidos en la primera etapa, utilizando la técnica de Esperón-Rojas *et al.* (2017), ajustada a la cantidad de lípidos extraídos de las muestras de tomate; a cada tubo con ácidos grasos se le añadieron 1.5 mL de H₂SO₄ 1 M en metanol, se calentó a 60°C durante 30 minutos en un termoblock; transcurrido este tiempo se retiraron las muestras del calor y se colocaron en baño de agua fría para detener la reacción, se le añadieron 2 mL de hexano, agitando durante 15 segundos en vortex, y a continuación, se agregaron 2.5 mL de NaCO₃ (a una concentración de 90 g/L), agitando en vortex nuevamente y se centrifugó después a 3500 rpm durante 10 minutos, separándose en dos fases. Se transfirió con pipeta Pasteur la fase superior (hexano) a los viales para inyectar en el cromatógrafo de gases.

En cuanto a la tercera etapa, la identificación y cuantificación de los ácidos grasos, se llevó a cabo en un Cromatógrafo Hewlett Packard Modelo 6890 (Wilmington DE) el cual tenía acoplada una columna HP-Innowax de 60 m × 0.250 mm. Se utilizó un detector FID (Detector de Ionización de flama). Las condiciones del método fueron 250 °C en el Detector; 150 °C en el detector y 80 °C en el horno, con un flujo de 0.9 mL/min.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tomate es susceptible al daño por frío, caracterizado por una superficie picada, zonas oscuras y acuosas y una susceptibilidad incrementada al decaimiento. El daño por frío se inicia a una temperatura específica en donde las enzimas degradativas de lípidos como la fosfolipasa D (PLD) y lipoxigenasa (LOX) son activadas por rigidificación de las membranas (Pinhero et al., 1998). Estas dos enzimas, han sido originalmente propuestas ser importantes en el catabolismo de lípidos, ya que inician una cascada lipolítica de deterioro en la membrana durante la senescencia y estrés (Paliyath y Thompson, 1987; Paliyath y Droillard, 1992). Un incremento en la actividad de la LOX en la membrana ha sido observado en respuesta a la exposición del estrés de daño por frío en tejido plantas de maíz (Pinhero *et al.*, 1998), pepino (Mao *et al.*, 2007), frutos de níspero (Cao *et al.*, 2009; Rui *et al.*, 2010) y tomate (Aghdam, 2013; Aghdam, *et al.*, 2014). Estudios en plantas indican que la acción PLD juegan un rol importante en la señalización a nivel de membrana y en la regulación celular. Si la PDL incrementa su actividad, dejará más ácidos grasos libres para que LOX actúe y por lo tanto los procesos bioquímicos que acompañan a la maduración se verán activados.

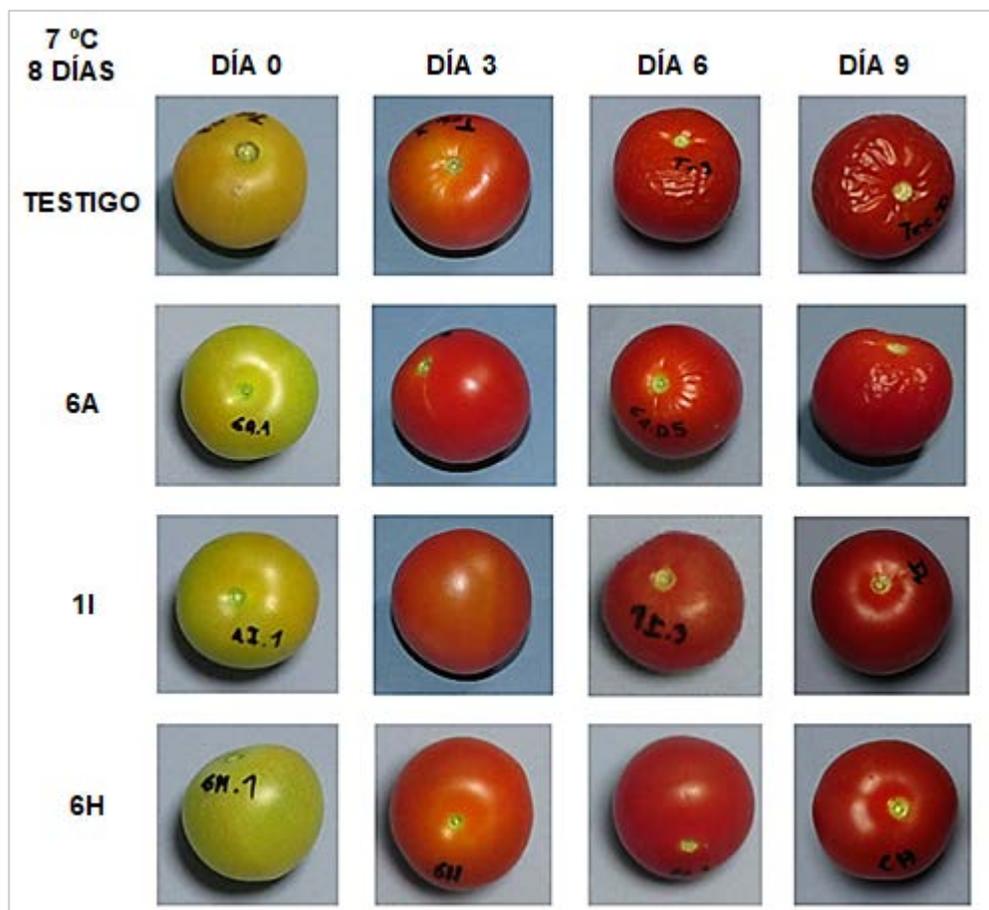


Figura 5. Apariencia de los frutos almacenados a 7 °C en cada punto de muestreo.

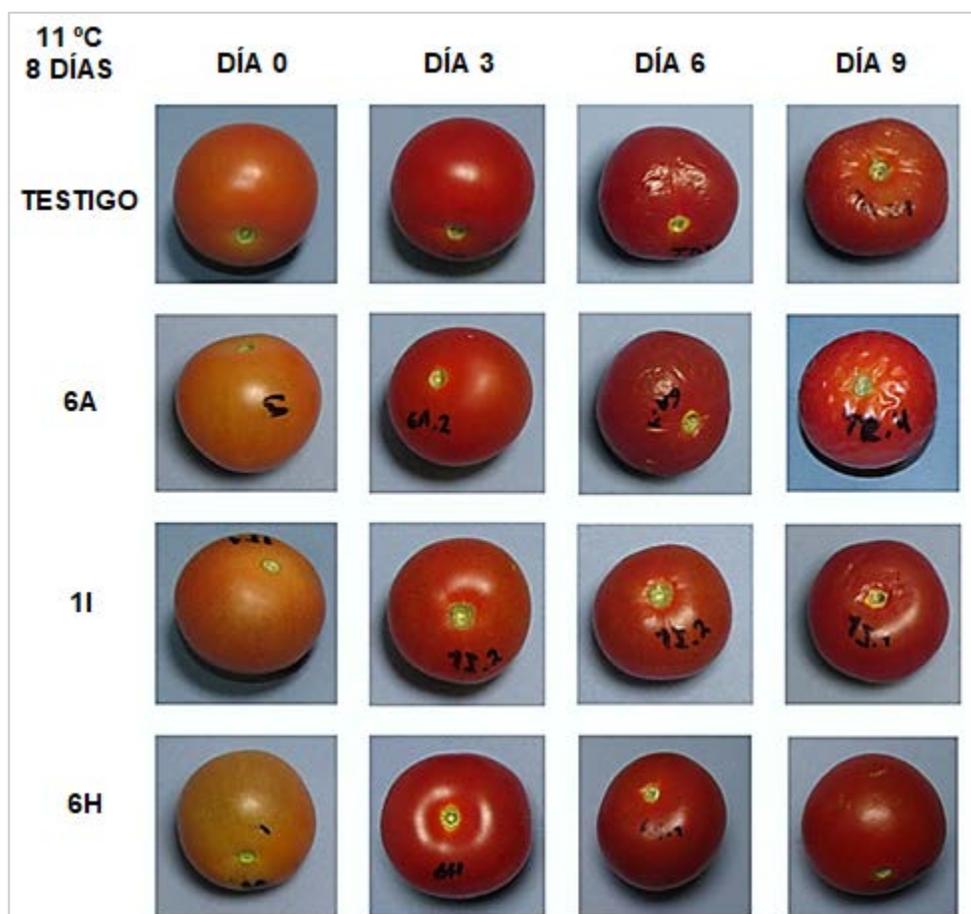


Figura 6. Apariencia de los frutos almacenados a 11 °C en cada punto de muestreo.

7.1. Confirmación de la transformación

Se confirmó la transformación de la línea 6H mediante la técnica de PCR, utilizando *primers* del gen *UIDA* que codifica para una región amplificada de 987 pb. que contenían la secuencia Directa: 5'-CTGGGTGGACGATATCACCG-3' y Reversa: 5'-TACGGCGTGGATACGTTAGC-3', usando DNA extraído de hojas, mediante el método de Plant DNAzol, bajo las condiciones mostradas en la tabla 2. Se realizó electroforesis en gel de agarosa 10 g L⁻¹ (1%) para comprobar la integridad del DNA y separación de genes por peso (figura 7) y se comprobó la presencia del gen de interés.

Tabla 6. Condiciones de la PCR.

| Etapa | Temperatura, °C | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-----------------|--------|--------|
| Desnaturalización inicial | 95 | 3 min | 1 |
| Desnaturalización | 95 | 15 s | 35 |
| Alineamiento | 55 | 15 s | 35 |
| Extensión | 72 | 1 min | 35 |
| Extensión final | 72 | 2 min | 1 |

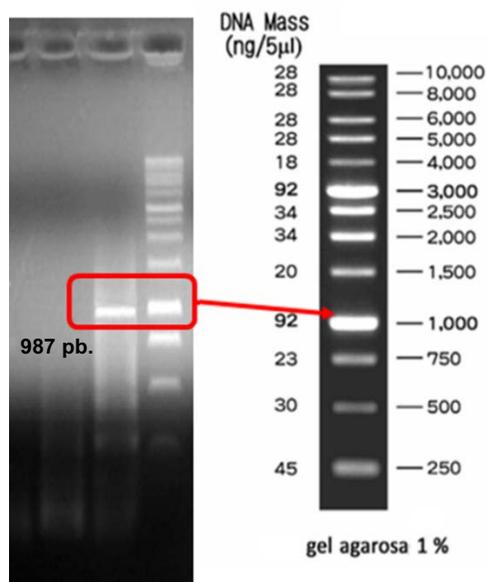


Figura 7. Gel de electroforesis de PCR: banda del gen *UIDA* 987 pb.

7.2. Evolución de color

Los frutos evaluados fueron sometidos a dos tratamientos: almacenamiento a 7 °C o a 11 °C por 8 días, teniendo una maduración post-frío de 8 días a temperatura ambiente de 24 °C ± 1 °C, periodo en el que realizaron los análisis correspondientes cada tres días durante 9 días, partiendo del día en que fueron retirados del almacenamiento (D0, D3, D6 y D9) .

Los parámetros de color son un indicativo visual de maduración en los frutos de tomate, así como un atributo muy importante a nivel comercial (Efiuwewewere y Thorne, 1988). El sistema más común utilizado es el CIE L*a*b*, donde L* indica luminosidad, a* y b* son coordenadas de cromaticidad (Olivas y Barbosa-Cánovas, 2005) con las que se puede calcular °Hue (color) y croma (saturación de color). Individualmente, el cambio de color entre las líneas evaluadas de cada cinética presentó una tendencia similar, siendo diferente entre tratamientos.

Se puede observar que para el muestreo D9 todas las líneas, tanto transgénicas como testigo, de ambos tratamientos, alcanzaron un color de alrededor de 40 °Hue, formando parte del rango de colores rojizos (ver figura 4), color alcanzado en el estado de maduración 6 (ver figura 3).

Sin embargo, el color de los frutos almacenados a 7 °C fue de, aproximadamente 80 °Hue, que se encuentra en el rango de colores amarillentos (ver figura 4) al salir del almacenamiento, mientras que el de los frutos almacenados a 11 °C era de alrededor de 45 °Hue (colores rojizos), evidentemente, más maduros en comparación.

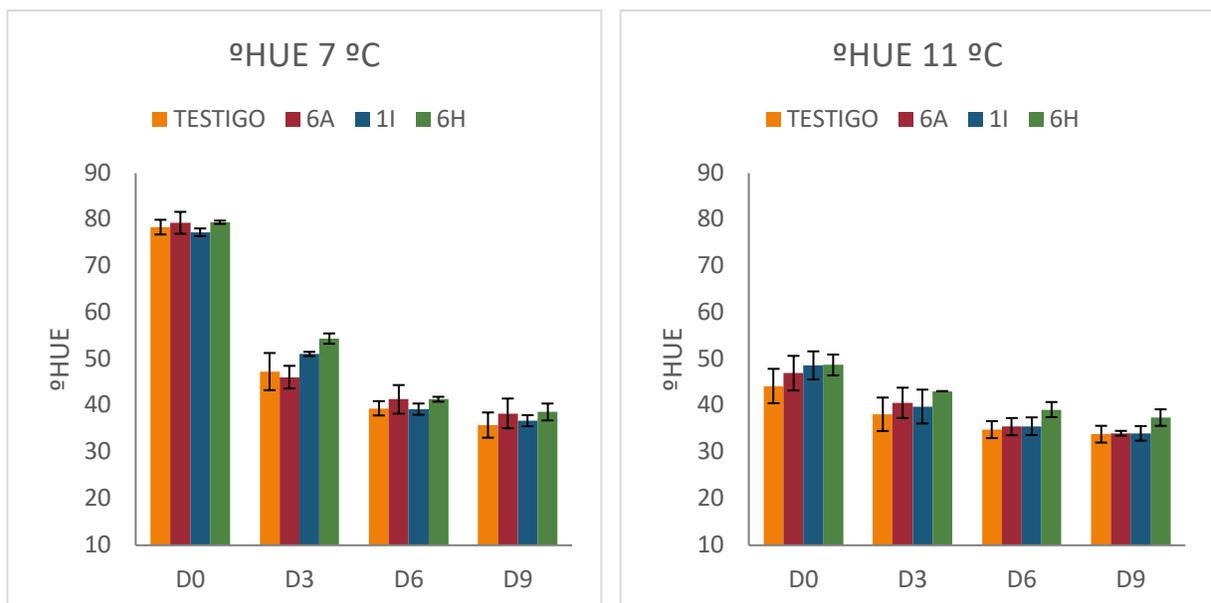


Figura 8. Cambio de °Hue en color externo.



Figura 9. Apariencia de frutos de cada línea en D0 y D9 almacenados a 7 y 11 °C.

A) Frutos almacenados a 7 °C durante 8 días, en D0, líneas: Testigo, 6A, 1I, 6H. **B)** Frutos almacenados a 7 °C durante 8 días, en D9, líneas: Testigo, 6A, 1I, 6H. **C)** Frutos almacenados a 11 °C durante 8 días, en D0, líneas: Testigo, 6A, 1I, 6H. **D)** Frutos almacenados a 11 °C durante 8 días, en D9, líneas: Testigo, 6A, 1I, 6H.

Siguiendo con el parámetro croma (saturación de color), en el tratamiento a 7 °C, las líneas transgénicas y la testigo no mostraron diferencias significativas, aunque en el día 9, la línea transgénica 1I muestra menor saturación que las demás y que la testigo. En el tratamiento a 11 °C hubo una variación más alta, pero de la misma manera en el día 9, la línea 6H exhibió una mayor saturación que las demás líneas y que la testigo.

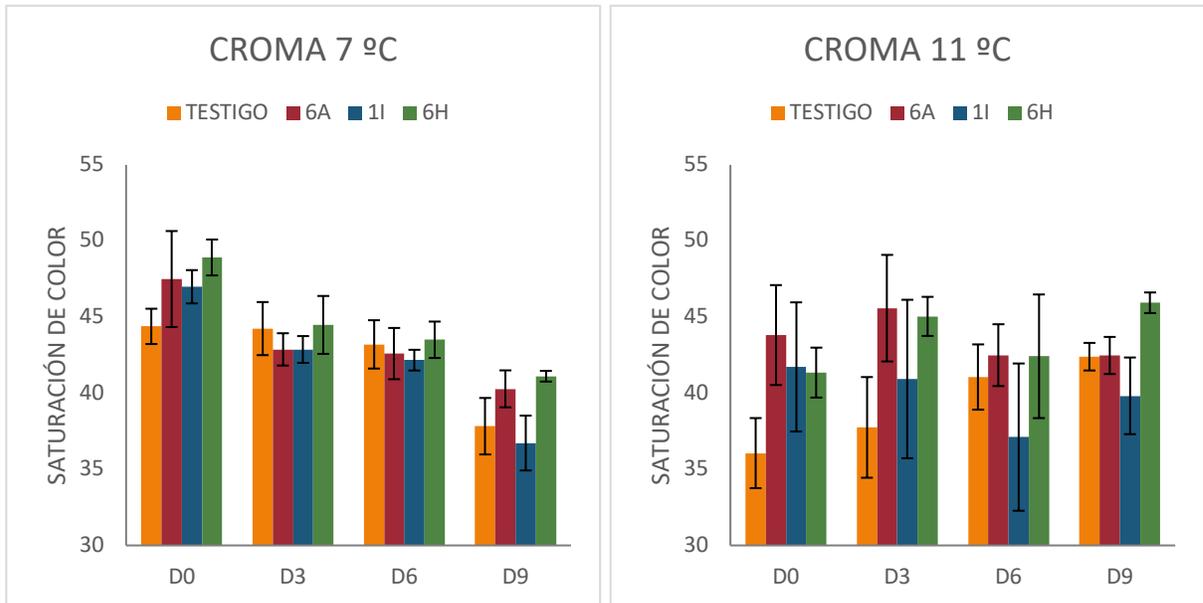


Figura 10. Seguimiento de croma en color externo.

En el atributo de luminosidad, como se esperaba, se observa una tendencia en decremento en todas las líneas en ambos tratamientos (7 y 11 °C), siendo los frutos del tratamiento a 7 °C los que iniciaron con un valor mayor. Se observa que las líneas 1I y 6H son iguales entre sí y diferentes a la línea testigo, mientras que la línea 6A no mostró diferencia significativa con el testigo. Por su parte, los frutos del tratamiento a 11 °C tuvieron un decremento de luminosidad entre los puntos D0 y D3, con una pérdida menor en los siguientes puntos, sin diferencia significativa en ninguna línea. A diferencia del tratamiento a 7 °C donde la luminosidad decreció gradualmente.

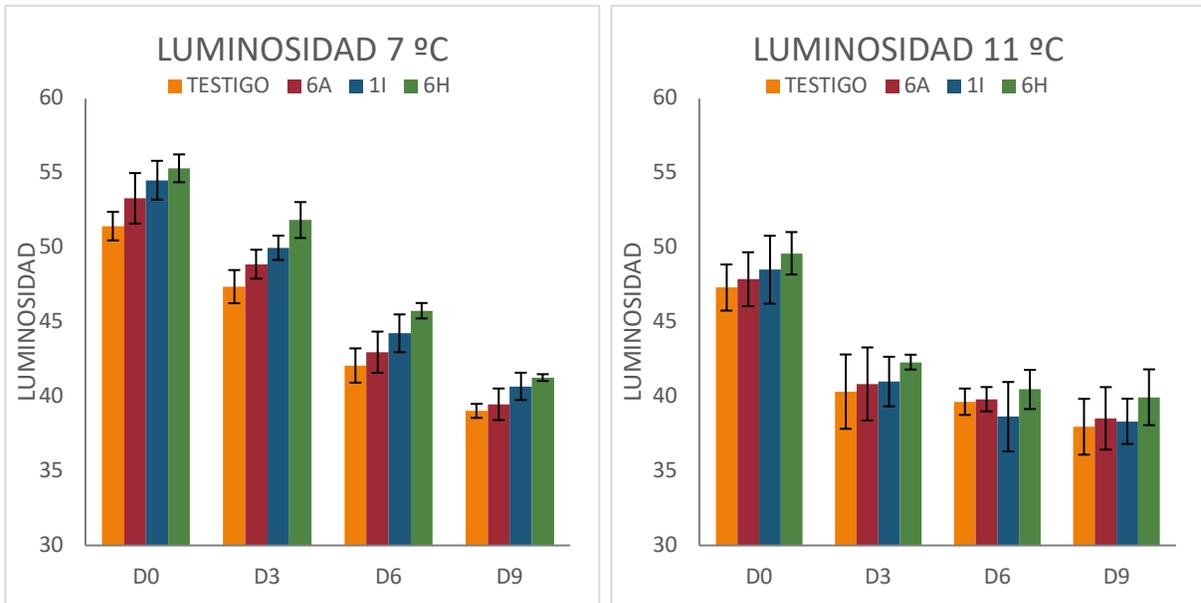


Figura 11. Cambio de luminosidad en color externo.

7.3. Firmeza

Además del color, la firmeza es una característica importante de la calidad de las frutas y verduras, y es de los principales factores que afectan la percepción sensorial y la aceptación de los alimentos por parte del consumidor (Oey *et al.*, 2008). Conforme avanza la maduración y senescencia de un fruto, su firmeza disminuye. Como se tenía contemplado, todas las líneas de cada tratamiento siguen este comportamiento de pérdida de firmeza, siendo el tratamiento a 7 °C el que tuvo firmezas mayores para cada línea en comparación con el tratamiento a 11 °C, que también mostró una firmeza inicial menor y una pérdida mayor de firmeza al final de los muestreos. Esto fue probablemente debido a la diferencia en el estado de maduración en el que se encontraban los frutos al salir de sus respectivos almacenamientos. Cabe destacar que en cada tratamiento las líneas 1I y 6H fueron significativamente diferentes a la línea testigo, mientras que la línea 6A, en el tratamiento a 7 °C, no muestra diferencia significativa con las otras tres líneas, siendo totalmente diferente de 1I y 6H en el tratamiento a 11 °C e igual a la línea testigo, sin diferencias significativas en D0 y D3, pero diferente en D6 y D9.

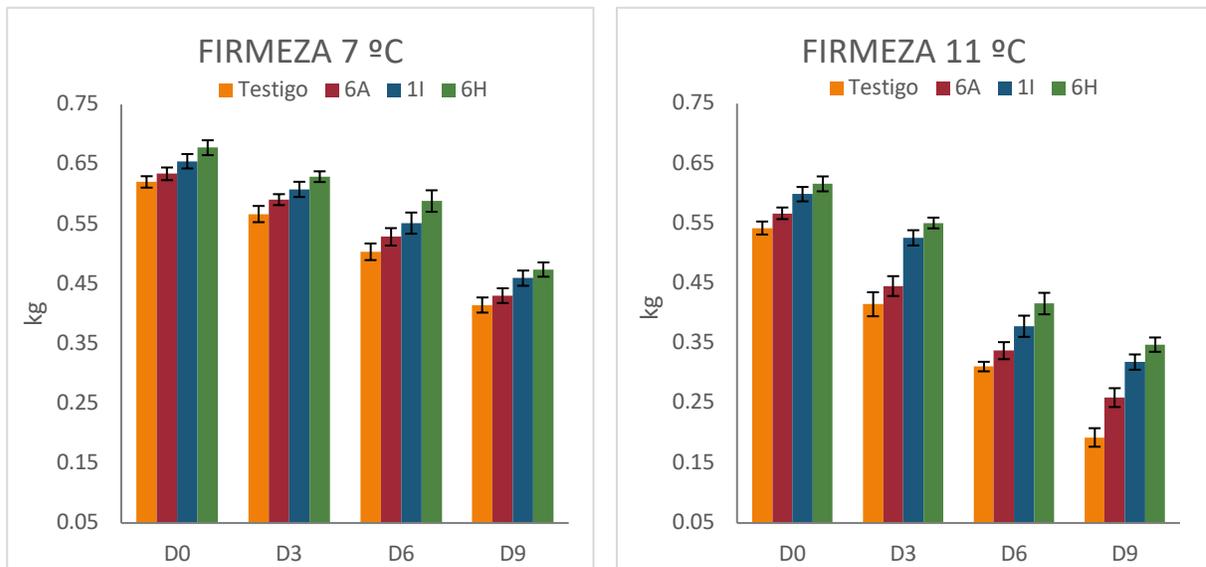


Figura 12. Pérdida de firmeza.

7.4. Actividad de LOX

En cuanto a la actividad de LOX, se confirmó que fue menor en las líneas genéticamente modificadas, esto como consecuencia del silenciamiento del gen *TomloxB*. La enzima LOX desencadena las reacciones de peroxidación en los lípidos de la membrana plasmática. Con la enzima silenciada, es decir, con una menor actividad, se podría mantener más alto el nivel de insaturación de los lípidos y aumentar la fluidez de la membrana (Lee *et al.* 2005), disminuyendo los síntomas del daño por frío. Además, pretratamientos que desaceleren el aumento en la actividad de LOX durante el almacenamiento en frío tienen un efecto positivo sobre los frutos, como lo evidencian Aghdam *et al.* (2012), quienes aplicaron soluciones de ácido salicílico en diferentes concentraciones en frutos de tomate, lo cual tuvo efecto sobre negativo sobre LOX y fosfolipasa D (PLD). Por su parte Rui *et al.* (2010) sometieron frutos de níspero a un tratamiento térmico (38 °C - 5 h) teniendo como resultado una disminución en la actividad de LOX y PLD. En ambos casos el daño por frío fue menor al del testigo.

También es posible observar que la actividad de LOX en D9 es mayor en el tratamiento a 7 °C, lo cual se atribuye posiblemente al daño por estrés que sufren las enzimas a menor temperatura, propiciando una mayor actividad de la enzima.

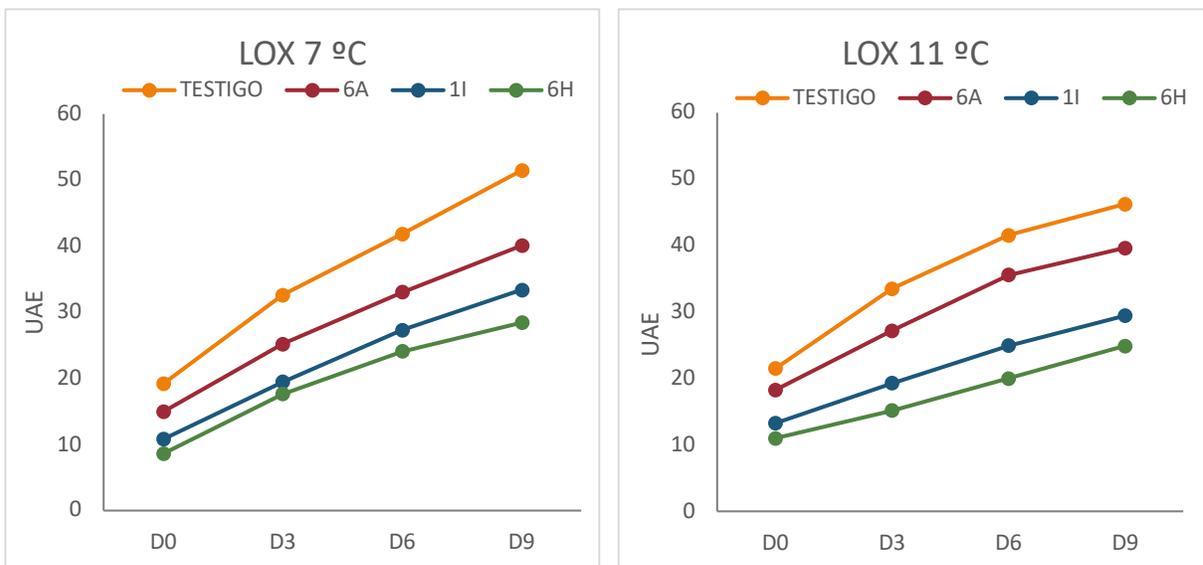


Figura 13. Actividad de la LOX.

7.5. Contenido de ácido linoleico y linolénico.

Se cuantificó el contenido de los ácidos grasos linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3). Estos ácidos grasos forman parte importante de las membranas celulares y son también el principal sustrato de LOX (Vick y Zimmerman, 1987; Baysal y Demirdöven, 2007; Bai *et al.*, 2011; Feussner y Wasternack, 2002).

Durante la maduración hay un decaimiento general en el contenido de fosfolípidos. Además, hay un incremento sustancial en la síntesis de esteroides acompañada por marcados cambios en la composición y conjugación en el esteroide (Whitaker 1988, 1994). A bajas temperaturas, el contenido de fosfolípidos decrece y la concentración de esteroide se incrementa; sin embargo, esto no fue acompañado por una maduración del fruto (Whitaker, 1993).

En las figuras 12 y 13 se observa que el contenido de estos dos ácidos grasos disminuye con el tiempo y que es menor en la línea testigo, siendo significativamente

diferente de las líneas transgénicas. Este hecho se vio reflejado en la apariencia de los frutos, ya que fueron los que mostraron mayor deterioro (figura 9). Por otra parte, en el tratamiento a 7 °C se cuantificó una mayor cantidad de estos lípidos en comparación con el tratamiento a 11 °C (ver gráficas 12 y 13), presumiblemente conservando por más tiempo la integridad de la membrana debido a la menor degradación de C18:2 y C18:3.

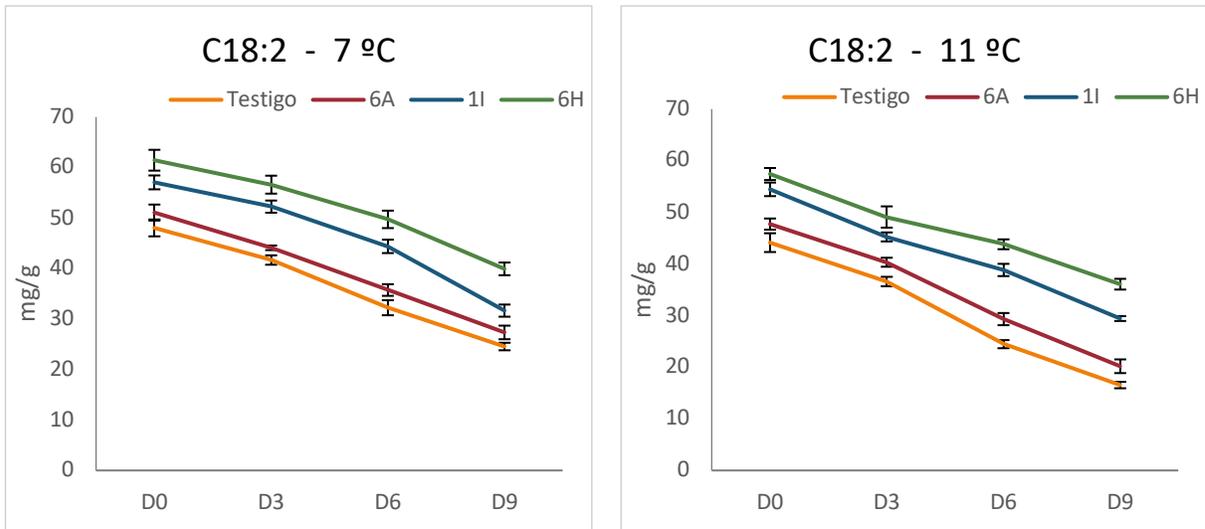


Figura 14. Contenido de ácido linoleico (C18:2).

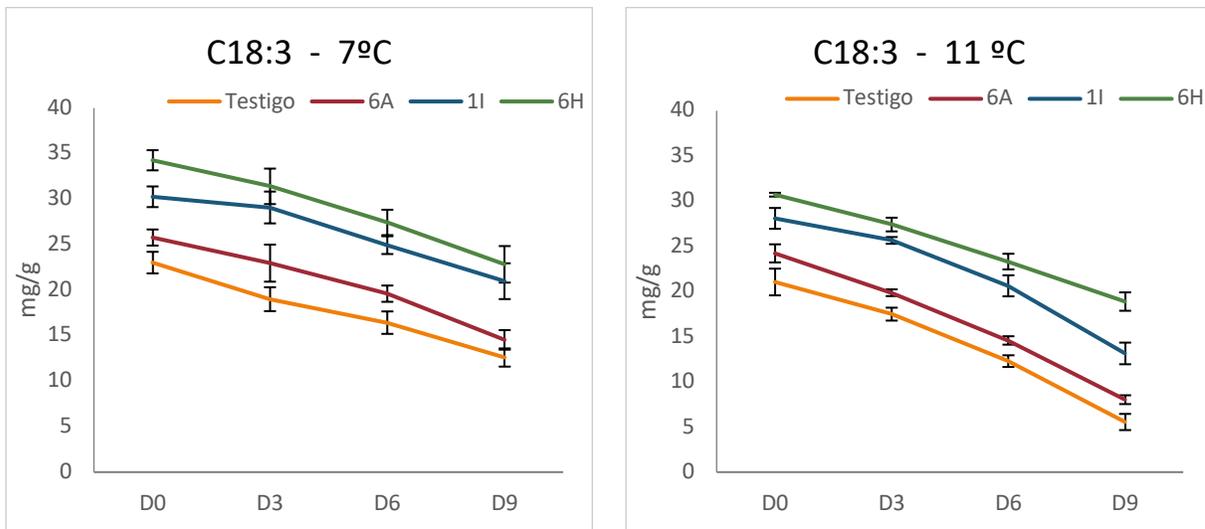


Figura 15. Contenido de ácido linolénico (C18:3).

Los síntomas del daño por frío incluyen en la maduración adecuada de los frutos, provocando la formación de picaduras, desarrollo irregular del color y el aumento de la descomposición post-cosecha. Estos síntomas generalmente no aparecen hasta que los tomates se transfieren a temperaturas no frías (Morris, 1982). El desarrollo de síntomas de daño por frío puede ser la consecuencia de la oxidación del exceso de especies reactivas de oxígeno que inducen la peroxidación y la degradación de los ácidos grasos insaturados en los lípidos de la membrana (Lyons, 1970).

En las siguientes tablas se muestra el incremento en el contenido de ácido linoleico y ácido linolénico del tratamiento a 7 °C con relación al tratamiento a 11 °C, comparando cada línea en cada uno de los puntos de muestreo.

Tabla 7. Relación del contenido de C18:2 entre tratamientos.

| C18:2 | Día 0 | Día 3 | Día 6 | Día 9 |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| TESTIGO | 0.09 | 0.14 | 0.32 | 0.48 |
| 6A | 0.07 | 0.09 | 0.22 | 0.35 |
| 1I | 0.05 | 0.16 | 0.14 | 0.08 |
| 6H | 0.07 | 0.15 | 0.14 | 0.11 |

Tabla 8. Relación del contenido en porciento de C18:3 entre tratamientos.

| C18:3 | Día 0 | Día 3 | Día 6 | Día 9 |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| TESTIGO | 0.09 | 0.09 | 0.34 | 1.27 |
| 6A | 0.06 | 0.16 | 0.35 | 0.81 |
| 1I | 0.08 | 0.13 | 0.21 | 0.60 |
| 6H | 0.12 | 0.15 | 0.18 | 0.21 |

7.6. Producción de etileno y CO₂.

El etileno actúa como hormona vegetal de maduración en los frutos climatéricos, regula la maduración y senescencia debido a que estimula la expresión de genes que codifican para enzimas relacionadas con los cambios durante estas etapas (Jiang y Fu, 2000), como es el caso del tomate. Tiene un papel doble en la postcosecha: por un lado, ocasiona que los frutos adquieran características sensoriales óptimas para su consumo, pero también es responsable de la senescencia de los tejidos, generando efectos desfavorables en la calidad (Bapat *et al.*, 2010).

En las gráficas de producción de etileno se observa que hay diferencia entre las líneas evaluadas según los tratamientos aplicados. En el caso del tratamiento a 7 °C, el pico de etileno de la línea testigo se presentó en el día 3 (D3), mientras que en las líneas modificadas fue en el día 6 (D6), mostrando retraso en la maduración. Por su parte, en el tratamiento a 11 °C el pico de etileno de la línea testigo también ocurrió en D3, así como el de las líneas transgénicas 6A y 1I, siendo la línea 6H la que tuvo un retraso mas claro en el pico de etileno, el cual se manifestó en D6, al igual que en otro tratamiento a 7 °C. Lo anterior tiene sentido al tomar en cuenta el retraso evidente en la maduración en el que se encontraban los frutos al término del almacenamiento. La máxima producción de etileno de las líneas 1I y 6H nunca fue superior a la máxima producción de las líneas testigo y 6A.

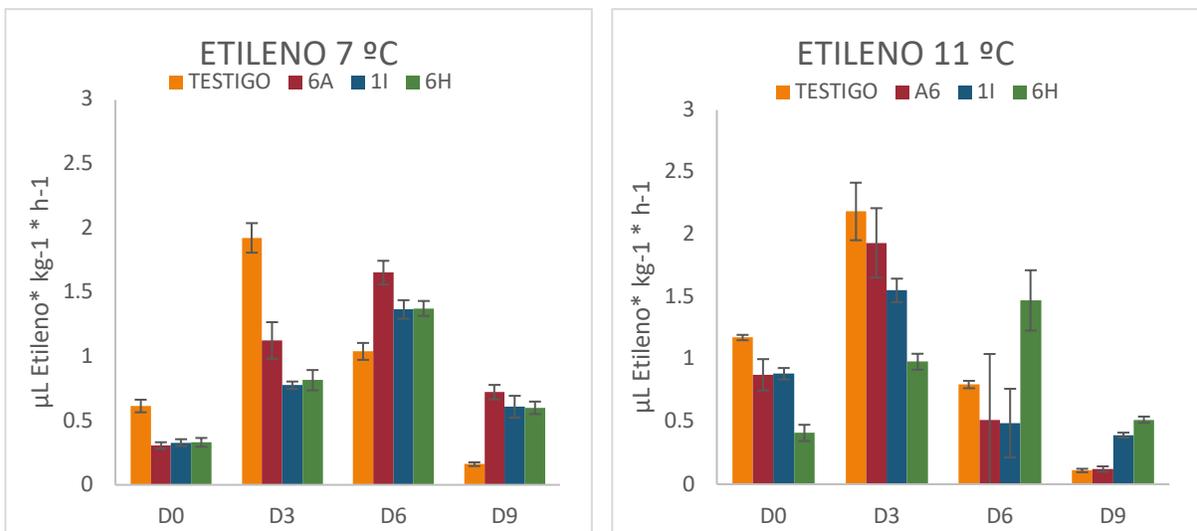


Figura 16. Producción de etileno.

Mientras tanto, la producción de CO₂ en el tratamiento a 7 °C tuvo una tendencia de incremento, con diferencia entre la línea testigo y las modificadas (6A, 1I y 6H). En cambio, el comportamiento de la producción de CO₂ de las líneas testigo, 6A y 1I, en el tratamiento a 11 °C, es similar al de la producción de etileno, con un incremento en

D9, debido a la senescencia de los frutos, sin embargo, el comportamiento de 6H es parecido al del tratamiento a 7 °C.

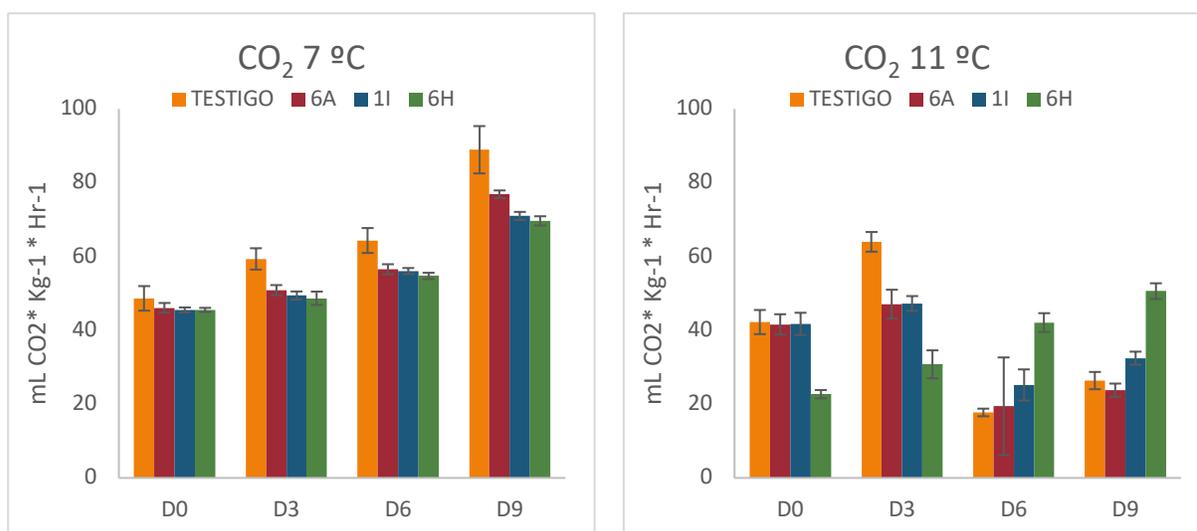


Figura 17. Producción de CO₂.

7.7. Contenido de sólidos solubles.

Sensorialmente, el sabor en los frutos depende de la compleja interacción de los azúcares, los ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, así como de compuestos volátiles que puedan impartir sabor. En ello radica la importancia de la cantidad de azúcares en el fruto. A su vez, los azúcares, así como los ácidos orgánicos, son los principales sustratos de la respiración (Seymour, 1993).

En este experimento, el contenido de sólidos solubles de todas las líneas evaluadas de ambos tratamientos (7 y 11°C) fue en aumento, siendo 1I y 6H diferentes de la testigo, y, a su vez, 6H, fue diferente de las demás. La línea 6A, en algunos días de análisis no tuvo diferencia con la línea testigo y con la línea 1I. En general no se observaron diferencias entre en tratamientos a 7 y 11 °C.

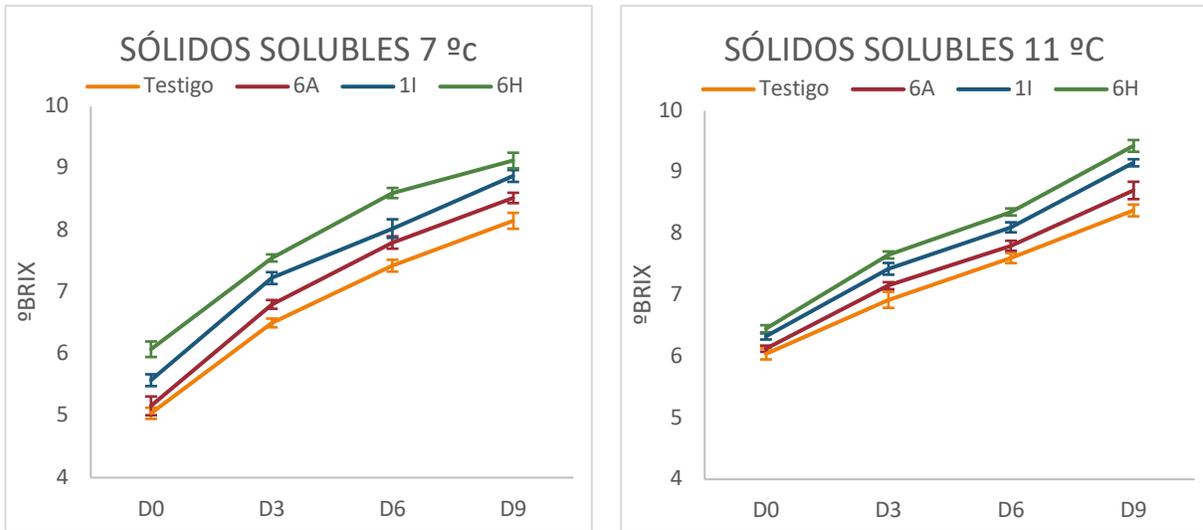


Figura 18 Evolucion del contenido de sólidos solubles.

7.8. pH y acidez

El pH y la acidez son variables que se complementan. Los ácidos orgánicos, como el ácido cítrico, son utilizados como sustratos durante la respiración. Al existir un aumento en la acidez los valores de pH de dichas líneas disminuyeron recíprocamente. En este caso podemos apreciar que hay correspondencia entre el aumento de pH y la disminución de ácido cítrico para cada tratamiento, así como diferencias significativas entre todas las líneas, siendo el tratamiento a 11 °C el que mostró, tanto mayor incremento de pH, como mayor disminución en el contenido de ácido cítrico, mientras que a 7 °C es menor, hecho que corresponde al retraso en la maduración de estos frutos.

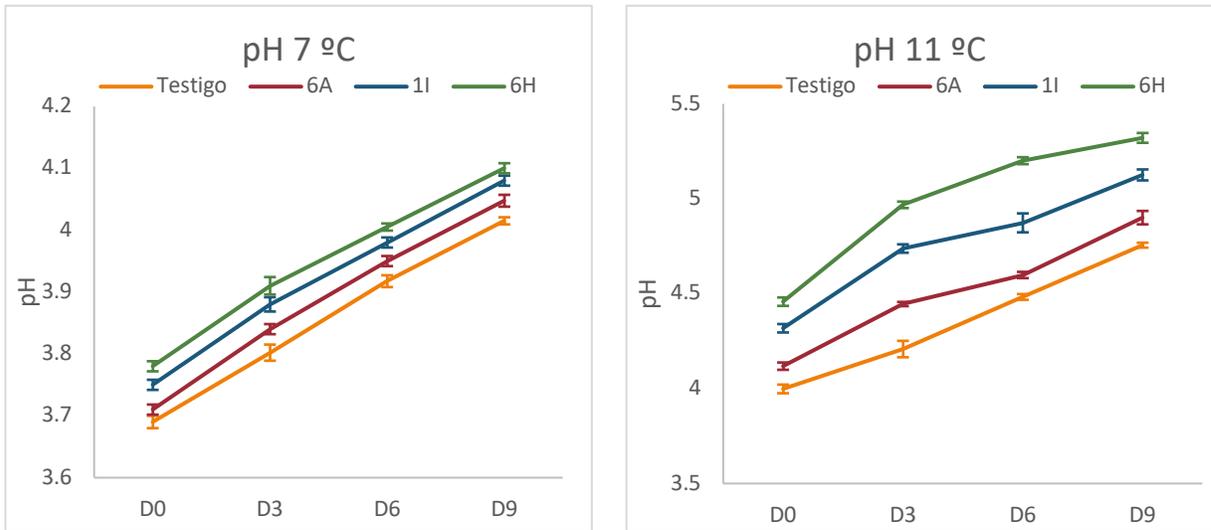


Figura 19. Cambio de pH.

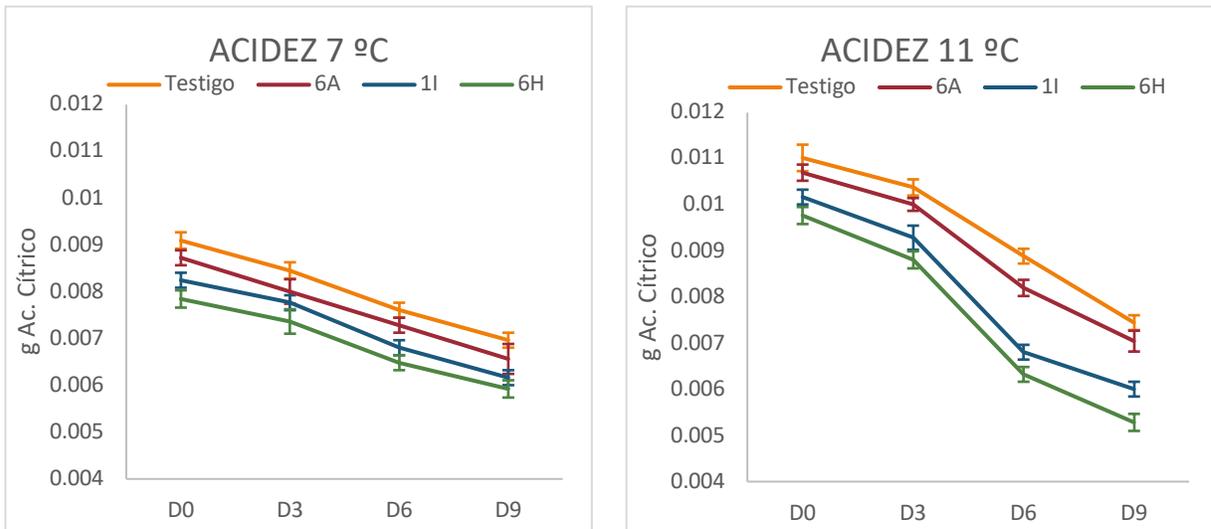


Figura 20. Contenido de acidez como ácido cítrico.

7.9. Pérdida de peso.

En cuanto a la pérdida de peso, se ha reportado que un incremento en la actividad de LOX está asociado con un incremento en la pérdida de agua en hojas de tabaco (Gong *et al.*, 2003). Para esta evaluación el muestreo se extendió un punto, llegando al día 12 (D12), que no se muestra en los demás parámetros evaluados, para conseguir 4

puntos de pérdida de peso. Mientras que todas las líneas presentan la misma tendencia en el comportamiento del tratamiento a 11 °C es, disminuyendo gradualmente hasta P3 y aumentando en P4, el comportamiento del porcentaje de pérdida de peso en el tratamiento a 7 °C fue más errático, sin mostrar diferencias significativas entre las líneas evaluadas, salvo por el último punto.

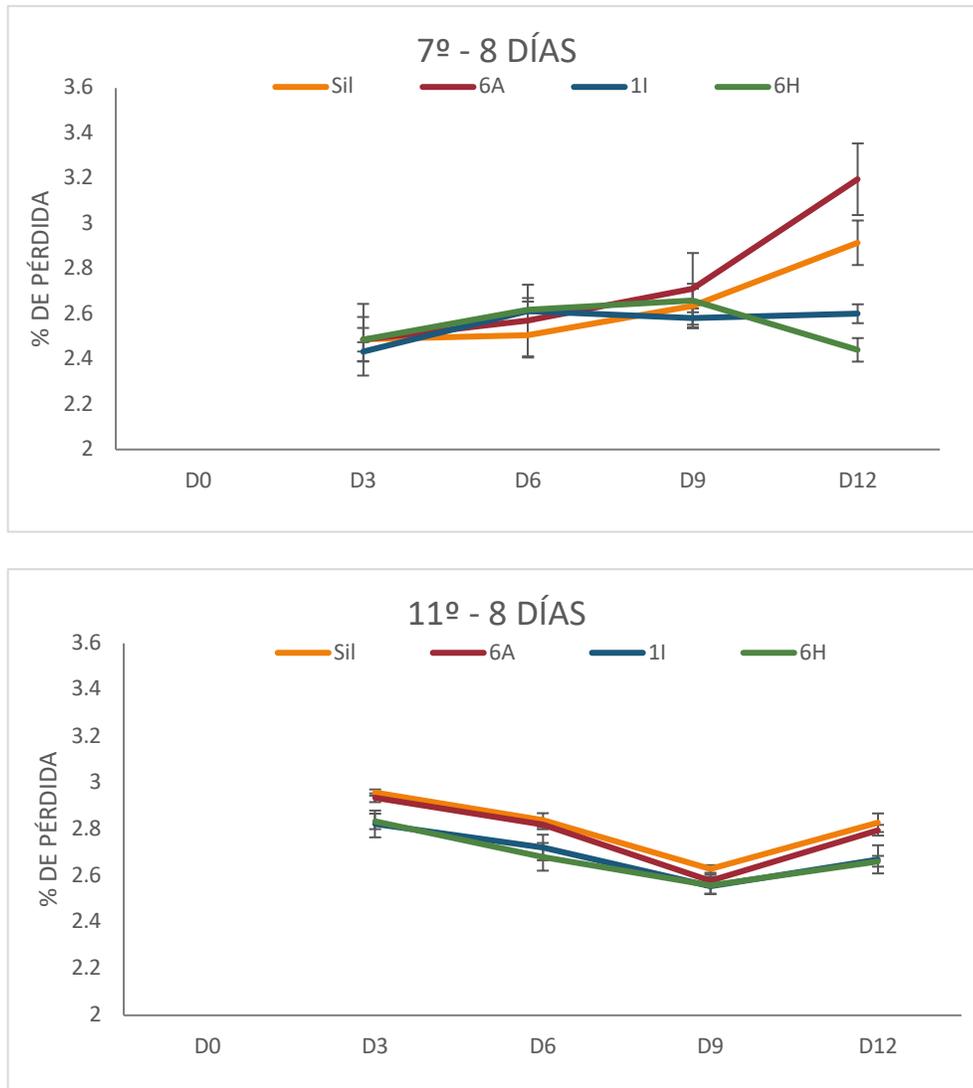


Figura 21. Pérdida de peso.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó la actividad de LOX, contenido de ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y linolénico) y la fisiología de tomates modificados genéticamente con silenciamiento del gen de *TomloxB*, en respuesta a dos condiciones de estrés por frío (7 y 11 °C) durante ocho días de almacenamiento con una maduración posterior a temperatura ambiente (24±1 °C).

En el caso del tratamiento a 7 °C, fue perceptible el retraso en la maduración, como se muestra en la figura 6, lo cual se comprobó al analizar los parámetros evaluados, siendo particularmente evidente en color, producción de etileno, pH y acidez.

Las líneas 1I y, en especial, 6H manifestaron mejores resultados y más consistente que 6A, línea que no tuvo diferencia significativa con la línea testigo, a pesar de tener una actividad de LOX menor, y que al mismo tiempo fue, de las tres evaluadas en el presente trabajo, la línea genéticamente modificada con mayor actividad de la enzima en ambos tratamientos, por lo que se puede afirmar que, los frutos genéticamente modificados con silenciamiento del gen *TomloxB*, al tener mayor cantidad de C18:2 y C18:3 presentan una fluidez de membrana superior debido a una proporción más alta de ácidos grasos insaturados, como consecuencia manifiestan retraso en la maduración, retraso en la senescencia y mayor resistencia al daño por frío que frutos sin modificación.

Los frutos de la línea 6H se mantuvieron en mejores condiciones en los dos tratamientos (7 y 11 °C) ya que no presentaron síntomas de daño por frío.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aghdam, M. S. 2013. Mitigation of postharvest chilling injury in tomato fruit by prohexadione calcium. *J Food Sci Technol.* 50(5), pp. 1029-1033.
2. Aghdam, M. S., Asghari, M., Khorsandi, O. y Mohayeji, M. 2014. Alleviation of postharvest chilling injury of tomato fruit by salicylic acid treatment. *Journal of Food Science and Technology.* 51, Número 10, pp. 2815.
3. Bai, J., Baldwin, Elizabeth A., Imahori, Yoshihiro, Kostenyuk, Igor, Burns, Jacqueline y Brecht, Jeffrey K. 2011 Chilling and heating may regulate C6 volatile aroma production by different mechanisms in tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit. *Postharvest Biology and Technology.* 60, pp. 111–120
4. Bapat, V. A., Trivedi, P., K., Ghosh, A., Sane, V. A., Ganapathi, T. R. y Nath, P. 2010. Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances.* 28, pp. 94-107.
5. Baysal, Taner y Demirdöven, Aslihan. 2007. Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme and Microbial Technology.* 40, pp. 491-496.
6. Brash, A. R. 1999. Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem.* 274 (34), pp. 23679-82.
7. Chen, G., Hackett, R., Walker, D., Taylor, A., Lin, Z. y Grierson, D. 2004. Identification of a Specific Isoform of Tomato Lipoxygenase (TomloxC) Involved in the Generation of Fatty Acid-Derived Flavor Compounds. *Plant Physiology.* 136 (1), pp. 2641-2651.
8. Dorais, M., Ehret, D.L. y Papadopoulos, A.P. 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochem Rev.* 7, pp. 231-250.
9. Efiuvwewere, B. y Thorne, S. N. 1988. Development of Chillin Injury Symptoms in stores Tomato Fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 44(4), pp. 215-226.
10. Esperón-Rojas, A. A., Baeza-Jiménez, R., Cano-Sarmiento, C. y García, H. S. 2017. Structured Mono- and Diacylglycerols with a High Content of Medium Chain Fatty Acids. *Journal of Oleo Science.* 21, pp. 489-95.

11. Foolad, M. R. 2007. Genome Mapping and Molecular Breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*. 2007, ID 64358, 52 pp.
12. Feussner, I. y Wasternack, C. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2002. 53, pp. 275-97.
13. Frankenberger, E.A., Hasegawa, P.M. y Tigchelaar, E.C. 1981. Influence of environment and developmental state on the shootforming capacity of tomato genotypes. *Z Pflanzenphysiol*; Volumen 10, pp. 221-232.
14. Hatanaka, A. 1993. The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry*. 34, pp. 1201-1218.
15. Jiang, Y. y Fu, J. 2000. Ethylene regulation of fruit ripening: Molecular aspects. *Plant Growth Regulation*. 30, pp. 193-200.
16. Labate, J.A., Grandillo, S., Fulton, T., Muños, S. y Caicedo, A.L. 2007. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Vol 5. Chapter 1. C. Kole editors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
17. Lee, S.H., Ahn, S.J., Im, Y.J., Cho, K., Chung, G.C., Cho, B.H., Han, O. 2005. Differential impact of low temperature on fatty acid unsaturation and lipoxygenase activity in fig leaf gourd and cucumber roots. *Biochem. Biophys. Res.* 330, pp. 1194-1198.
18. Lurie, S., Laamim, M., Lapsker, Z. y Fallik, E. 1997. Heat treatments to decrease chilling injury in tomato fruit. Effects on lipids, pericarp lesions and fungal growth. *Physiologia Plantarum*. 100, pp. 297-302.
19. Lyons, J. M. y Raison, J. K., 1970. Oxidative Activity of Mitochondria Isolated from Plant Tissues Sensitive and Resistant to Chilling Injury. *Plant Physiol.* 45, pp. 386-389.
20. Mao, L., Pang, H., Wang, G. y Zhu, C. 2007. Phospholipase D and lipoxygenase activity of cucumber fruit in response to chilling stress, *Postharvest Biology and Technology*. 44, pp 42-47.
21. Saltveit, M. E. y Morris, L. L. 1982. Chilling injury of horticultural crop: an overview. Pp. 161-162 HortScience, (17).
22. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2013, El cultivo de tomate con buenas prácticas agrícolas en las agricultura urbana y periurbana, pp. 72, E-ISBN 978-92-5-307780-9.

23. Oey, I., Lille, M., Van Loey, A. y Hendrickx, M. 2008. Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review, *Food Science & Technology*. 19 (6), pp 320-328.
24. Paliyath, G. y Droillard, M.J. 1992. The mechanisms of membrane deterioration and disassembly during senescence. *Plant Physiol Biochem*. 30, pp. 789-812.
25. Paliyath, G. y Thompson, J. E. 1987. Calcium- and Calmodulin-Regulated Breakdown of Phospholipid by Microsomal from Bean Cotyledons. *Plant Physiol*. 83, pp. 63-68.
26. Parkin, K. L. y otros, 1989. Chilling injury. A review of possible mechanisms. *Journal of Food Biochemistry*. Issue 13, pp. 127-153.
27. Pinhero R. G., Paliyath G., Yada R. Y., y Murr D. P. 1998 Modulation of phospholipase D and lipoxygenase activities during chilling. Relation to chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol Biochem*. 36 (3), pp. 213-224.
28. Porta, H. y Rocha-Sosa, M. 2002. Plant Lipoxygenases. Physiological and Molecular Features. *Plant Physiology*. 130(1), pp. 15-21.
29. Schiller, D. y otros 2015. A dual positional specific lipoxygenase functions in the generation of flavor compounds during climacteric ripening of apple. *Horticulture Research*. 2.
30. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimento (SAGARPA), 2005, PC-020-2005 Pliego de condiciones para el uso de la marca oficial México calidad suprema en tomate, pp. 22.
31. Seymour, G.B. Taylor, J.E. y Tucker, G.A. 1993. Biochemistry of fruit ripening. Springer Science+Business Media Dordrecht. Expo Holdings, Malaysia. p 454.
32. Soto-Rodríguez, I., Campillo-Velázquez, P. J., Ortega-Martinez, J., Rodríguez-Estrada, M. T., Lercker, G. y Garcia, H. S. 2008. Cholesterol oxidation in traditional mexican dried and deep-fried food products. *J Food Compos Anal*. 21, pp. 489-95.
33. Thorne, S. N. y Efiuvwevwere, B. 1988. Changes in Organic Acids in Chilled Tomato Fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 44(4), pp. 309-319.
34. Vick, Brady A. y Zimmerman, Don C. 1987. Oxidative Systems for Modification of Fatty Acids: The Lipoxygenase Pathway. pp. 53-90 En The Biochemistry Plants Vol. 9 (Ed. Stumpf, P. K. y Conn, E. E.) Academic Press, Inc, Orlando, Florida.

35. Yang, J., Fu, M.-r., Zhao, Y.-y. y Mao, L.-c. 2009. Reduction of Chilling Injury and Ultrastructural Damage in Cherry Tomato Fruits After Hot Water Treatment. *Agricultural Sciences in China*, March. 8, pp. 304-310.
36. Wang, C. Y. 1993. Approaches to reduce chilling injury of fruits and vegetables. *Hortic Rev.* 15, pp. 83-95.
37. Whitaker, B.D. (1986). Fatty-acid composition of polar lipids in fruit and leaf chloroplasts of 16:3 and 18:3 plant species. *Planta*. 169: 313-319.
38. Whitaker, B. (1994). Lipid changes in mature-green tomatoes during ripening, during chilling, and after rewarming subsequent to chilling. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119: 994-999.