



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A. C.**

**EFFECTO DE ISOTIOCIANATOS EN LA BIOSINTESIS
DEL ETILENO EN TOMATE**

Por:

I. B. Liliana Guadalupe Alfaro Sifuentes.

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Febrero 2014

APROBACIÓN

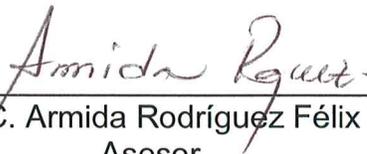
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Liliana Guadalupe Alfaro Sifuentes la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias



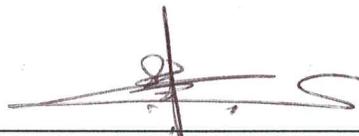
Dra. Rosalba Troncoso Rojas
Directora de tesis



Dr. Martin Ernesto Tiznado Hernández
Asesor



M. C. Armida Rodríguez Félix
Asesor



M. C. Alberto Sánchez Estrada
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

CONACYT por el apoyo prestado durante el posgrado.

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

Coordinación de Tecnologías de Alimentos de Origen Vegetal

A mi Directora de tesis, Dra. Rosalba Troncoso Rojas quien confió en mí y me dio todo su apoyo, también por su gran paciencia, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por su dedicación, por sus consejos, por ser una amiga muchas gracias doctora hizo de esta maestría una gran experiencia de aprendizaje.

A los miembros del comité de tesis: Dr. Martin Ernesto Tiznado Hernández, M. C. Armida Rodríguez Félix y M. C. Alberto Sánchez Estrada. Gracias por todo el tiempo y consejos que me brindaron.

A mis amistades: Iván, Isabel, Andrés, Tavo, Faby, Araceli, Javier, Eduardo, Lucido, Tafolla, Luisana, Daniel, Christian, Ari, Luis. Gracias por tantos momentos agradables que me hicieron pasar y por el apoyo brindado, hicieron de esta estancia un tiempo agradable.

DEDICATORIA

Primero que nada quiero dar gracias Dios por haberme permitido estar en CIAD y poder lograr terminar la maestría.

A mis padres, José Luis y Rosalía, que siempre han estado conmigo apoyándome en cada decisión tomada, quienes siempre me motivaron y me ayudaron con sus palabras de amor y aliento. A mis hermanos Jesús y Rosalía, por los cuales quiero ser un ejemplo a seguir. Gracias por ser mi familia, los amo.

A mi esposo Gabriel quien fue el motivo de mi estudio de posgrado, quien me presentó a la mejor asesora que pude haber tenido, quien siempre estuvo conmigo dándome su apoyo, gracias a él la estancia lejos de mi familia fue mucho más sencilla de superar, gracias a él que ha cambiado tanto mi vida en estos dos últimos años....Te amo corazón.

A mi hijo, esa personita tan importante que vino a cambiar TODO en mí, quien hizo que le tomara más sabor a mis estudios y al esfuerzo, por quien pienso ser mejor persona cada día...Por ti mi amor Iktan Gabriel Romero Alfaro.

A una gran familia que me estuvo apoyando desde el inicio también, quienes me abrieron las puertas de su casa y me brindaron su cariño, muchas gracias tía Aida, tío Pale, Ulises, Yuridia, Tania, Tomas y a toda la familia y amistades allegadas. Me hicieron la estancia en Hermosillo más fácil.

A mis suegros Viki y Gabriel quienes me han brindado su amor y apoyo; a mis cunados quienes fueron parte de esta aventura conviviendo conmigo como mis roomies por un tiempo Ángel, Hugo y Adán.

A mis grandes amigos del alma de CIAD que quiero mucho, Isela, Valentín y Gaby, que hicieron de estos dos años una de las mejores experiencias de mi vida.

Y a toda mi familia, quienes siempre han creído en mí, en mis logros y en mis metas, en especial a la abuelita más maravillosa del mundo Paula Sandoval Acosta, te amo abuelita.

CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras.....	X
Lista de Cuadros.....	Xii
Resumen.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1.EL TOMATE.....	4
2.1.1. Producción.....	4
2.1.2. Calidad postcosecha.....	5
2.1.2.1. Calidad externa.....	6
2.1.2.1.1. Color.....	6
2.1.2.1.2. Textura.....	7
2.1.2.1.3. Tamaño.....	8
2.1.2.1.4. Forma.....	9
2.1.2.1.5. Daños.....	9
2.1.3. Maduración.....	9
2.1.3.1. Respiración y producción de etileno.....	11
2.2.ETILENO.....	12
2.1.4. Biosíntesis.....	13
2.1.4.1. Metionina.....	15
2.1.4.2. S-Adenosil-metionina (SAM).....	16
2.1.4.3. 1-Amino-ciclopropano-carboxilato (ACC) sintasa.....	17
2.1.4.4. Ácido 1-amino-ciclopropano-carboxílico (ACC)...	18
2.1.4.5. 1-Amino-ciclopropano-carboxilato (ACC) oxidasa.....	19
2.1.5. Activación del etileno.....	20
2.1.6. Inhibición.....	21
2.3.ISOTIOCIANATOS.....	22
2.1.7. Estructura química.....	22
2.1.8. Propiedades de los isotiocianatos.....	23
2.1.9. Mecanismo de acción.....	25
3. HIPÓTESIS.....	29
4. OBJETIVOS.....	30

4.1. Objetivo general.....	30
CONTENIDO (Continuación)	
4.2. Objetivos específicos.....	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
5.1. Selección de frutos.....	31
5.1.1. Color.....	32
5.1.2. Determinación de la producción de etileno.....	32
5.2. Etapa 1: Determinación del efecto de los isotiocianatos en la producción de etileno.....	33
5.2.1 Determinación de la producción de etileno.....	33
5.3. Etapa 2: Determinación del efecto del isotiocianato en la biosíntesis de etileno en frutos de tomate.....	34
5.3.1. Determinación de metionina.....	34
5.3.1.1. Extracción.....	34
5.3.1.2. Análisis de metionina.....	35
5.3.2. Determinación de SAM (S-adenosil-metionina).....	35
5.3.2.1. Extracción.....	35
5.3.2.2. Determinación por HPLC.....	35
5.3.3. Determinación de la actividad enzimática de ACC sintasa.....	36
5.3.4. Determinación del contenido de ACC.....	37
5.3.5. Determinación de la actividad enzimática de ACC oxidasa.....	37
5.3.6. Determinación de la producción de etileno.....	37
5.3.7. Diseño experimental y análisis estadístico.....	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
6.1. Color y producción de etileno de los frutos.....	39
6.2. Etapa 1: Efecto de los isotiocianatos en la producción de etileno en frutos de tomate.....	41
6.2.1. Producción de etileno en tomates expuestos con Alil	42

Isotiocianato.....

CONTENIDO (Continuación)

6.3. Etapa 2: Efecto del Alil isotiocianato 0.5 mM sobre la síntesis de etileno en tomate expuesto por 6 y 12 horas.....	49
6.3.1. Contenido de metionina.....	49
6.3.2. Contenido de S-Adenosil-L-metionina (SAM).....	51
6.3.3. Actividad de ACC sintasa (ACCs).....	55
6.3.4. Contenido de Acido 1-Aminociclopropano-1-carboxílico (ACC).....	58
6.3.5. Actividad de ACC oxidasa (ACCo).....	61
6.3.6. Efecto del AITC 0.5 mM en la producción de etileno en tomate.....	64
7. CONCLUSIONES.....	70
8. BIBLIOGRAFIA.....	71

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
1. Producción mundial de tomate.....	5
2. Biosíntesis y regulación del etileno (SAM: S-adenosil metionina; ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxílico; MTR: metiltioribosa; MTA: metiltioadenosina; ATP: Adenosina trifosfato; ADP: Adenosin difosfato; CoA, CoASH; Coenzima A).....	14
3. Biosíntesis de la Metionina (CBL: cistationa β -lialasa; MS: metionina sintasa; SAM: S-adenosilmetionina; SAMS: SAM sintasa; SAMDC: SAM descarboxilasa; MTA: metil-tioribosa; MMT: metionina S-metiltransferasa; SMM: S-metilmetionina; HMT: homocisteína S-metiltransferasa).....	16
4. Hidrólisis de glucosinolatos.....	23
5. Posible mecanismo de reacción de los isotiocianatos con cisteína y lisina en condiciones fisiológicas.....	27
6. Enzimas y metabolitos participantes en la síntesis de etileno..	28
7. Producción de etileno en tomates expuestos por diferentes tiempos y a distintas concentraciones de AITC.....	44
8. Producción de etileno en tomates expuestos por diferentes tiempos y a distintas concentraciones de BITC.....	45
9. Cambios en la calidad visual de tomate almacenado a 25°C a los 0, 8 y 11 días posteriores a la exposición con AITC por 24 h (A: Testigo a los 0 días; B: frutos expuestos al AITC a los 0	

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

días; C: Testigo a los 8 días post-tratamiento; D: frutos expuestos al AITC a los 8 días post-tratamiento; E: frutos expuestos al AITC a los 11 días post-tratamiento; F: desprendimiento de cutícula).....	48
10. Contenido de metionina en tomate expuesto al AITC 0.5 mM por 6 y 12 h y evaluados durante 24 horas a 20°C.....	51
11. Contenido de SAM de tomate expuesto por 6 y 12 al AITC 0.5 mM y evaluado durante 24 h a 20°C.....	53
12. Actividad de ACCs de tomate expuesto por 6 y 12 h al AITC 0.5 mM y evaluado durante 24 h a 20°C.....	57
13. Contenido de ACC en tomate expuesto por 6 y 12 h al AITC 0.5 mM y evaluados durante 24 h a 20°C.....	60
14. Actividad de ACCo en tomate expuesto por 6 y 12 h al AITC 0.5 mM y evaluado durante 24 h a 20°C.....	62
15. Producción de etileno en tomate expuesto por 6 y 12 h al AITC 0.5 mM y evaluado durante 24 h a 20°C.....	66

LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro</i>	<i>Pagina</i>
1. Clasificación del color en tomate.....	7
2. Color en los frutos de tomate seleccionados.....	39
3. Efecto de los isotiocianatos, concentración y tiempos de exposición en la producción de etileno en tomate a 20°C.....	43
4. Porcentaje de inhibición en los niveles de los diferentes metabolitos y enzimas participantes en la biosíntesis de etileno, de tomate expuesto al Alil isotiocianato 0.5 mM.....	68

RESUMEN

Los isotiocianatos (ITC) son compuestos azufrados con diversas propiedades biológicas, como antibacteriana, antimicótica y anticancerígena, entre otras. Asimismo, se ha reportado que la aplicación de estos compuestos puede disminuir la producción de etileno en frutos; sin embargo, se desconoce el mecanismo mediante el cual reducen la producción de etileno. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los isotiocianatos en ciertos metabolitos y enzimas del ciclo de Yang mediante la determinación en la producción de etileno, actividad enzimática y concentración de metabolitos utilizando el fruto de tomate como modelo de estudio. Los tomates en estado de desarrollo rosa se trataron con alil-isotiocianato (AITC) y bencil-isotiocianato (BITC), a cinco concentraciones (0, 0.1, 0.5, 1 y 2 mM), y 4 tiempos de exposición (0, 6, 12 y 24 horas). Se seleccionaron los tratamientos de AITC 0.5 mM con 6 y 12 horas (h) de exposición para determinar los niveles de metionina, S-adenosilmetionina (SAM), 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACCs), contenido del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACCo) y producción de etileno. Los resultados indican que los tomates expuestos al AITC 0.5 mM por 6, 12 y 24 h, presentaron porcentajes de reducción en la producción de etileno de 52.5, 69.9 y 72.87%, respectivamente, con respecto al testigo. La exposición de tomate al AITC 0.5 mM por 6 y 12 h tuvo un efecto significativo en los metabolitos Metionina, SAM y ACC, así como en el nivel de actividad enzimática ACC sintasa y ACC oxidasa, y en la producción de etileno. La exposición de los frutos por 12 h provocó una mayor disminución en el contenido de los metabolitos y en los niveles de las enzimas evaluadas, observándose porcentajes de disminución de 54.57, 14.49, 65.94, 76.38, 92 y 64%, para Metionina, SAM, ACC sintasa, ACC, ACC oxidasa y etileno, respectivamente. El nivel de la enzima ACC oxidasa en tomate expuesto al AITC por 12 h, presentó el mayor porcentaje de disminución (92%) con respecto al testigo. Se concluye que el AITC a una concentración de 0.5 mM y expuesto por 6 y 12 h reduce la actividad del ciclo de Yang y

consecuentemente la producción de etileno mediante la reducción en el contenido de los metabolitos Metionina, S-adenosilmetionina, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico e inhibición en la actividad de las enzimas 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa y 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa.

Palabras clave: Tomate, alil-isotiocianato, bencil-isotiocianato, ciclo de Yang, Metionina, S-adenosilmetionina, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa, 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, etileno.

ABSTRACT

Isothiocyanates (ITC) are sulfur compounds with diverse biological properties, such as antibacterial, antifungal and anticancer, among others. It has also been reported that the application of these compounds can reduce the production of ethylene in fruit, but the mechanism that reduces ethylene production is still largely unknown. The objective of this study was to evaluate the effect of the isothiocyanates on certain metabolites and enzymes of the Yang cycle by determining the production of ethylene, enzyme activity, and metabolite concentration using tomato fruit as a study model. Tomato in pink ripening state was treated with allyl isothiocyanate (AITC) and benzyl isothiocyanate (BITC), at five different concentrations (0, 0.1, 0.5, 1 and 2 mM), during (0, 6, 12 and 24 hours). AITC 0.5 mM treatments was selected with 6 and 12 hours (h) of exposure time to determine the content of methionine, S-adenosyl-methionine (SAM), 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), and the activity levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACC), 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene production. The results indicate the isothiocyanates inhibited the ethylene production in tomato. Fruits exposed to AITC 0.5 mM for 6, 12 and 24 h, showed percentages of reduction in ethylene production of 52.5, 69.9 and 72.87 %, respectively, compared with the control. AITC 0.5 mM treatment for 6 and 12 h showed a significant effect on methionine, SAM and ACC metabolites, as well as on the enzymatic activity of ACC synthase and ACC oxidase enzymes, and the production of ethylene. Exposure for 12 h induced a inhibition percentage of 54.57, 14.49, 65.94, 76.38, 92 and 64 % for methionine, SAM, ACC synthase, ACC, ACC oxidase and ethylene production, respectively. The level of the enzyme ACC oxidase in tomato exposed to AITC for 12 h, had the highest percentage decrease (92%) compared with the control. We conclude that the AITC at a concentration of 0.5 mM and exposed for 6 and 12 h reduces the activity of the Yang cycle and

consequently the production of ethylene by decreasing the content of the metabolites methionine, S-adenosyl-methionine, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and inhibiting the activity of the enzymes 1-aminocyclopropane - 1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase.

Keywords: Tomato, allyl isothiocyanate, benzyl isothiocyanate, Yang cycle, Methionine, S-adenosyl-methionine, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, 1 - aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase, ethylene.

1. INTRODUCCIÓN

El tomate es un cultivo de gran importancia comercial para México y muchos otros países (FAO, 2010). Es un producto perecedero, que después de alcanzar el estado maduro firme, la vida de anaquel es generalmente de 8 a 10 días si se aplica una temperatura dentro del intervalo recomendado (7-10°C) (Davis, 2013). Sin embargo, las pérdidas después de la cosecha son considerables, incluso superiores al 30% (Keller et al., 2013). Las principales causas de deterioro incluyen pudriciones, daños mecánicos, sobremaduración y marchitamiento (Davis, 2013). Para minimizar estas pérdidas y garantizar la calidad de los frutos durante el transporte y comercialización se han empleado inhibidores de desarrollo microbiano, de la acción del etileno o de la síntesis de etileno.

El etileno es una hormona vegetal que regula la maduración en diversos frutos. Es sintetizado a partir de metionina en tres pasos: (1) conversión de metionina a S-adenosilmetionina (SAM) catalizada por la enzima SAM sintetasa, (2) formación del ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC) a partir de SAM y catalizada por la enzima 1-aminociclopropano carboxilato sintetasa (ACCs), y (3) la conversión del ACC a etileno, catalizada por la 1-aminociclopropano carboxilato oxidasa (ACCo) (Barry y Giovannoni, 2007; Gupta et al., 2013). El etileno juega un papel muy importante en el tomate debido a que por ser un fruto climatérico, éste sigue madurando una vez que ha sido cosechado, lo que impacta directamente en su vida postcosecha (Jiang et al., 2011). Es por ello que se han realizado diversos estudios para regular la producción de etileno, entre los cuales destacan: el uso de dinitrofenol, iones de cobalto (Lau y Yang, 1976; Yu et al., 1980), 1-metilciclopropeno, 3,3-dimetilciclopropano (Domínguez y Vendrell, 1993)

2,4-dinitrofenol (Yu et al., 1980) y los compuestos que reaccionan con los grupos –SH de proteínas, entre los que se encuentran los isotiocianatos (Patil y Tang, 1974; Plich, 1993).

Los isotiocianatos son compuestos producidos por las Brassicas, obtenidos por la hidrólisis de un glucosinolato y la acción de la enzima mirosinasa (Troncoso y Tiznado, 2013). Son considerados como los antimicrobianos más potentes y biocidas de amplio espectro; además son biodegradables e inoocuos para la salud humana (Delaquis y Mazza, 1995).

Estudios previos realizados por Troncoso et al., (2005), evaluaron el efecto del bencil ITC en la producción de etileno y la actividad de la ACCo en frutos de tomate inoculados con *Alternaria alternata*. Los autores reportaron que además del efecto antimicótico se observó que el BITC aplicado a una concentración de 0.56 mg/mL (5.64 mM) durante 36 horas, redujo significativamente la producción de etileno. Además, en estudios realizados en el laboratorio, se observó que la aplicación de alil ITC a frutos de tomate, también redujo significativamente la producción de etileno y hubo una inhibición total en los niveles de actividad de la ACC oxidasa (Troncoso, 2005). Asimismo, Patil y Tang (1974), reportaron que la aplicación de 0.046 mM de bencil isotiocianato a papaya causa una inhibición del 60% en la producción de etileno de los frutos. Estos estudios sugieren la posible participación de los isotiocianatos en la inhibición de la síntesis de etileno. Sin embargo, aún se desconoce cómo actúan y su posible interacción con los componentes de la ruta biosintética del etileno.

En estudios realizados con proteínas de origen animal, se propuso que los ITCs pueden reaccionar con los grupos sulfhidrilo, amino o puentes disulfuro de las proteínas que se encuentran en los grupos laterales de los aminoácidos cisteína y lisina (Nakamura et al., 2009). En frutos, estos dos aminoácidos forman parte del sitio activo de las enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa, las cuales participan en la síntesis de etileno, por lo que es posible que los ITCs interactúen con esas enzimas inhibiendo su síntesis. En este contexto el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los isotiocianatos en la producción de

etileno en frutos de tomate y en los diferentes componentes de la ruta biosintética de esta fitohormona.

2. ANTECEDENTES

2.1. El Tomate

El tomate es nativo del oeste de América del sur, específicamente en el árido desierto costero de Perú (Fátima et al., 2008), con la llegada de los españoles se expandió al viejo continente y de ahí a todo el mundo. El tomate es uno de los vegetales más consumidos y ampliamente cultivados en el mundo. Pertenece a la familia de las solanáceas y el fruto es una baya. Con su comercialización y difusión lograda, actualmente forma parte de la dieta alimenticia de varias culturas en todo el mundo (Perera, 2000).

2.1.1. Producción

El principal productor de tomate a nivel mundial en el 2011 fue China con una participación del 30.4%, mientras que México ocupó el onceavo lugar (**Figura 1**) con un 2% de participación en la producción (SAGARPA, 2012).

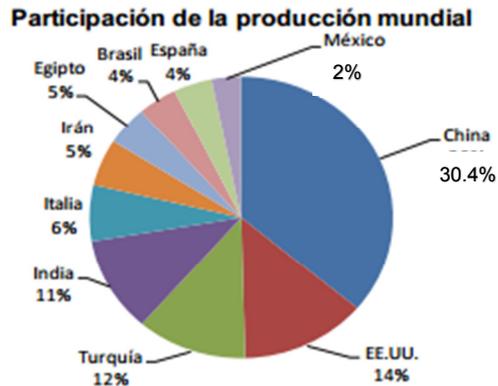


Figura 1: Producción mundial de tomate (SAGARPA, 2012).

Sin embargo, en el 2011 México ocupó el primer lugar en exportación de tomate, siendo Estados Unidos de América el principal importador (SAGARPA, 2012). La producción nacional de tomate en el 2012, fue de 2727,691 millones de toneladas (SAGARPA, 2013); siendo Sinaloa el principal estado productor, cuya producción representó el 35% del total nacional (SAGARPA, 2010). El cultivo de tomate se distribuye a todo lo largo del territorio nacional; sin embargo, la zona productora de mayor importancia es la noroeste.

2.1.2. Calidad Postcosecha

El término calidad tiene diversas definiciones y es un concepto muy subjetivo y difícil de definir. En productos hortofrutícolas la calidad está dada por una combinación de características, atributos y/o propiedades que le proporcionan un valor como alimento para humanos. El significado de la palabra calidad varía dependiendo del tipo de persona, por ejemplo, para los productores la calidad implica que el producto posea buena apariencia y pocos defectos

visuales; para distribuidores e intermediarios significa que el alimento mantenga buena apariencia, sea firme y que tenga larga vida de anaquel. Finalmente, los consumidores ven la calidad como una cuestión de buen aspecto, firmeza, sabor y valor nutritivo. La mayor parte de ellos compran con base en la apariencia y tacto, su satisfacción depende de la calidad comestible (Kader, 2002).

La calidad total en un tomate fresco para satisfacer el punto de vista tanto de productores, distribuidores y consumidores, se determina por su calidad externa y su calidad interna. Sin embargo, en este trabajo solo se enfocará en la calidad externa.

2.1.2.1. Calidad Externa. La calidad externa se determina por todas aquellas características que son perceptibles por la vista y el tacto, como son el color, textura, tamaño, forma y presencia/ausencia de daños.

2.1.2.1.1. Color. El color y la decoloración de muchos alimentos son importantes atributos de calidad en el mercado. Al madurar el tomate presenta un típico color rojo que aunque no refleja necesariamente un valor nutricional, el consumidor basado en sus experiencias lo asocia con buen sabor (Pomeranz y Meloan, 1978).

El color representa un buen control en la calidad de los frutos, y es un aspecto de calidad tan importante para la fruta que la mayoría de los estándares de calidad especifican la cantidad e intensidad de un color característico requerido para alcanzar un grado específico.

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) ha realizado una clasificación y estandarización de color en los tomates (Cuadro 1), los cuales se asocian con el estado de madurez y la calidad que poseen, facilitando de esta manera el entendimiento sobre las bases en que deben cosecharse y comercializarse (USDA, 2012).

Tanto las normas de los Estados Unidos de Norteamérica como las asociaciones de México establecen, según las circunstancias, los requisitos que el fruto deberá cumplir tanto para el mercado de exportación como el nacional.

Cuadro 1. Clasificación del color en tomate (USDA, 2012).

Grado de Madurez	Color	Descripción
	1 Verde /Green	La cáscara del tomate está completamente verde. El color verde puede variar de claro a oscuro.
	2 Quebrando/ Breaker	Existe un cambio del color verde hacia colores amarillo, rosado o rojo en no más del 10% de la superficie del fruto.
	3 Rayado/ Turning	Entre el 10 y el 30% de la superficie del fruto muestra un cambio definido del color verde hasta amarillo, rosado o rojo, o una mezcla de ellos.
	4 Rosa/ Pink	Entre el 30 y el 60% de la superficie del tomate tiene color rosa o rojo.
	5 Rojo claro/ Light Red	Entre el 60 y el 90% de la superficie del tomate muestra colores rosados o rojo
	6 Rojo/ Red	Más del 90% de la superficie del tomate tiene color rojo.

2.1.2.1.2. Textura. La textura de los cultivos hortofrutícolas es uno de los componentes críticos para la percepción del consumidor de la calidad del fruto de tomate. La textura depende de la turgencia, cohesión, forma y tamaño de las células, así como del tamaño del fruto, la dureza del pericarpio, la firmeza del tejido y la relación existente entre la pared radial del pericarpio y el material locular interno. La proporción de este tipo de tejidos influencia la propensión hacia la firmeza o ablandamiento del fruto (Al-Falluji et al., 1982; Chaib et al., 2007).

Durante la maduración normal del tomate el ablandamiento del tejido del pericarpio es la principal causa en la pérdida de textura y calidad. El

ablandamiento del tejido se atribuye a la disolución del material intercelular de la pared (Chaib et al., 2007).

La firmeza de la pulpa (pericarpio) es una variable de textura utilizada como índice de madurez para los frutos, y es de gran importancia ya que se puede considerar como un criterio y a la vez como un componente de calidad. La firmeza de los frutos cambia porque durante la maduración y senescencia ocurre una disolución de la lámina media, provocando una disminución en la adhesión intercelular, depolimerización y solubilización de polisacáridos hemicelulósicos y pectinas de la pared celular, afectando la permeabilidad de las membranas y causando una modificación en paredes celulares (Brummel y Harpster, 2001; Salveit, 2005).

Un ablandamiento suficiente es necesario para hacer comestible a un fruto, así como para liberar su contenido celular durante la masticación y permitir la percepción de su aroma y sabor; sin embargo, una buena firmeza (sin ser duro) es requerida para la distribución de los frutos de la cosecha hasta el consumidor (Frenkel y Jen, 1989; Abbott, 2004).

2.1.2.1.3. Tamaño. Los frutos de tomate continúan creciendo aún después de llegar a su madurez fisiológica. Se ha determinado que su tamaño puede incrementar apreciablemente justo antes de dar el primer cambio en color, es decir, al pasar del estado verde maduro al estado en que inicia el cambio de color. El tamaño del fruto guarda una correlación positiva con la madurez comercial y la calidad (Davis y Gardner, 1994).

En el mercado internacional el tamaño del tomate es importante. Existen estándares de calidad que clasifican al fruto con base en el tamaño. El USDA utiliza tamaños que varían de 45-90 mm de diámetro y con base en lo anterior los clasifica en pequeños, medianos, grandes y extragrandes, siendo este el índice de su precio en el mercado (Sargent y Moretti, 2002).

2.1.2.1.4. Forma. La forma de la fruta puede contribuir en la calidad de ésta al apegarse a las normas de preferencia estéticas por parte del consumidor y al diseño de empaques. La forma del tomate se expresa basándose en la proporción del diámetro ecuatorial y longitudinal de la fruta.

La forma no tiene un efecto directo en la calidad sensorial; sin embargo, la proporción existente entre el material locular interno y de la pared del fruto (que frecuentemente se refleja en la forma) tiene un efecto en la calidad sensorial de acuerdo a la proporción en que se encuentre cada uno de estos tejidos, pues son de composición muy diferente. Un tomate con forma irregular generalmente se asocia con las estructuras multiloculares (French y Jen, 1989).

2.1.2.1.5. Daños. Los daños pueden ser de tipo mecánico, fisiológico y/o microbiológico. Los de tipo mecánico son originados generalmente por manejo inadecuado durante o después de la cosecha. Estos se manifiestan como fisuras, magulladuras, hoyos, entre otros. Los de tipo fisiológico o anomalías metabólicas son ocasionados por altas o bajas temperaturas durante el almacenamiento, concentraciones elevadas de CO₂ y bajas de O₂, toxicidad por compuestos químicos, entre otros. Los microbiológicos son causados principalmente por hongos los cuales deterioran la calidad del fruto (Snowdon, 1991). La presencia de cualquiera de estos tipos de alteraciones en forma aislada o combinada daña la apariencia del fruto causando la pérdida en su calidad visual.

2.1.3. Maduración

La vida de un fruto se puede dividir en tres etapas fisiológicas fundamentales: crecimiento, maduración y senescencia. El crecimiento comprende el aumento del número de células y la expansión celular. De estos

dos procesos, la expansión celular es mayormente responsable del tamaño final alcanzado por el fruto. La maduración puede iniciarse antes de que termine la fase de crecimiento e incluye diferentes actividades metabólicas. A la senescencia se le puede definir como una fase en que los procesos anabólicos prevalecen sobre los catabólicos conduciendo así al envejecimiento y a la muerte del tejido (Kader, 2002; Salveit, 2005).

De las etapas anteriores, la maduración es considerada como la más importante y compleja del desarrollo del fruto. Esta se puede dividir en dos fases: la fase de maduración fisiológica y la de maduración comercial (Salveit, 2005). La maduración fisiológica suele iniciarse antes de que termine el crecimiento celular y finaliza, más o menos cuando el fruto tiene semillas para producir nuevas plantas. La evolución de la maduración fisiológica sólo se complementa adecuadamente cuando el fruto se encuentra en la planta. En cambio, la maduración comercial se refiere al proceso por el cual las frutas adquieren las características sensoriales que las define como comestibles. En general esta etapa es un proceso que comienza durante los últimos días de maduración fisiológica y que irreversiblemente conduce a la senescencia de la fruta (Kader, 2002).

La maduración de los frutos, como en el caso del tomate, es un proceso genéticamente programado que culmina en cambios que se producen entre los últimos estados de crecimiento y los primeros de senescencia (Watada et al., 1984). Esto implica una serie de procesos fisiológicos y bioquímicos, como la pérdida de clorofila, la síntesis de pigmentos (licopeno), el decremento en el contenido de almidón, la hidrólisis de pectinas y otros compuestos de la pared celular (Hobson y Davies, 1971). Estos cambios son regulados por la activación o supresión concurrente de los genes que estimulan la síntesis selectiva de enzimas críticas, que pueden verse estimulados por el medio ambiente y prácticas culturales (Schuch et al., 1989).

El signo más visible de la maduración en tomate es el cambio de color de verde a rojo (**Cuadro 1**), que se debe a la descomposición de la clorofila y a la síntesis de carotenoides, como el licopeno. Este cambio inicia en la madurez fisiológica. El segundo signo característico de la maduración es el ablandamiento que acompaña al cambio de color. El ablandamiento se ha asociado con una disminución en la rigidez y adhesión de la pared celular, siendo este un proceso complejo que involucra la participación ordenada de un número de componentes de la pared celular, incluyendo polisacáridos estructurales, enzimas y proteínas no enzimáticas (Brummell y Harpster, 2001; Huber et al., 2007; Krongyut et al., 2011). En durazno se ha reportado que el ablandamiento está relacionado con la modificación de los polisacáridos de la pared celular causado por enzimas degradadoras como poligalacturonasa, β -galactosidasa, pectin metilesterasa, entre otras (Brummell et al., 2004). A pesar de que se ha identificado un número determinado de hidrolasas que afectan la estructura de la pared celular, la relación entre estas enzimas y el ablandamiento de la fruta aún no es claro (Chaib et al., 2007). En tomate, Saladié et al., (2007) sugieren que durante el ablandamiento están involucrados múltiples procesos coordinados, incluyendo la disociación de las redes de polisacáridos en la pared primaria y lámina media, la pérdida de turgencia debido a la pérdida de agua por transpiración, y cambios estructurales y composicionales de la cutícula.

La temperatura óptima que asegura buena calidad sensorial y nutricional durante la maduración es 20°C. A esta temperatura el desarrollo de color es óptimo y la retención de vitamina C alta. Los tomates separados de la planta y madurados a temperaturas superiores a 25°C desarrollan un color más amarillo y menos rojo y son más blandos. Se ha reportado que una maduración rápida ocurre a temperaturas entre 12.5 - 25°C; con una humedad relativa de 90-95% (Trevor et al., 2013).

2.1.3.1. Respiración y Producción de Etileno. Debido a las necesidades energéticas y de oxígeno molecular, el fruto de tomate experimenta un aumento

en la velocidad de respiración, la cual es acompañada por un incremento en la producción de etileno al momento de iniciar la madurez comercial. A este fenómeno se le conoce como “climaterio” y ubica al tomate como un fruto “climatérico” (Grierson y Tucker, 1983).

A partir del climaterio, el tomate empieza a mostrar los primeros signos de madurez, los cuales son perceptibles visualmente. (Brecht, 1987). El proceso de maduración inicia en el tejido locular y de ahí avanza hacia la parte externa del fruto, por lo que los primeros cambios de color son en el tejido locular aun cuando el color externo del fruto es verde. Así mismo, los niveles de ACC, ACC sintasa y ACC oxidasa o enzima formadora de etileno se incrementan primero en el tejido locular, después en el eje central, posteriormente en el pericarpio radial y por último en la parte más externa del pericarpio, que es la cáscara. El incremento observado de dichas enzimas en los lóculos ocurre coincidentemente con la formación del gel, antes de la aparición del color rojo, y también es correspondiente con el primer incremento perceptible en la producción de etileno por la fruta entera (Brecht, 1987).

Se ha propuesto que las células loculares juegan un papel importante en la iniciación y progresión de la madurez comercial del tomate. Posiblemente estas células poseen mayor sensibilidad (umbrales de percepción bajos) al etileno, que las del tejido restante (Tieman y Handa, 1989). Se ha reportado que la tasa de producción de etileno está en los rangos de 1.2 - 1.5 $\mu\text{L kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a 10°C y 4.3 - 4.9 $\mu\text{L kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a 20°C (Trevor et al., 2013).

2.2. Etileno

El etileno (C_2H_4) es una sustancia orgánica muy simple, que tiene efectos muy importantes en la fisiología de las plantas. Además es considerada como una hormona vegetal que regula la maduración de los frutos mediante la expresión coordinada de genes responsables del incremento en la respiración, la

producción autocatalítica de etileno y los genes codificadores de enzimas que realizan los cambios en el color, textura, aroma y el sabor (Oetiker y Yang, 1995). El etileno representa un elemento importante del sistema de regulación endógeno, especialmente durante el desarrollo, maduración y envejecimiento. Sus efectos pueden ser benéficos o perjudiciales dependiendo de dónde y cómo actúe (Yang, 1985). A pesar de que muchos de los efectos del etileno en frutas y hortalizas son positivos económicamente, como en el desverdecimiento de los cítricos, reducción en la dureza de la pulpa, pérdida de acidez, también puede ocasionar deterioro en la calidad, como el ablandamiento acelerado, o sobremaduración causando graves pérdidas en la producción de frutas, hortalizas y flores (Kader, 2002; Plich, 2003).

El etileno es fisiológicamente activo en concentraciones muy bajas medidas en partes por millón (ppm, $\mu\text{L L}^{-1}$) a partes por mil millones (ppb, nL L^{-1}) (Keller et al., 2013). Se ha reportado que 0.1 nL/g.h es el umbral suficiente para inducir la respuesta al etileno (Yokotani et al., 2009). En el caso de tomate, Kader (2002) lo clasifica como productor moderado de etileno, cuya producción puede variar de $1 \text{ a } 10 \mu\text{L kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ a 20°C .

2.1.1. Biosíntesis

Existen varios compuestos químicos de los cuales podría sintetizarse el etileno. Entre estos compuestos se encuentra el ácido linolénico, etanol, alanina, metionina, entre otros. Sin embargo, solamente metionina se ha reportado como precursor del etileno en plantas superiores (Lieberman, 1979).

En el ciclo de la biosíntesis del etileno (**Figura 2**) ocurren tres reacciones principales que determinan el ritmo de su formación, estos son:

- La síntesis de SAM a partir de metionina y ATP;
- La conversión de SAM a ACC;
- La oxidación de ACC a etileno

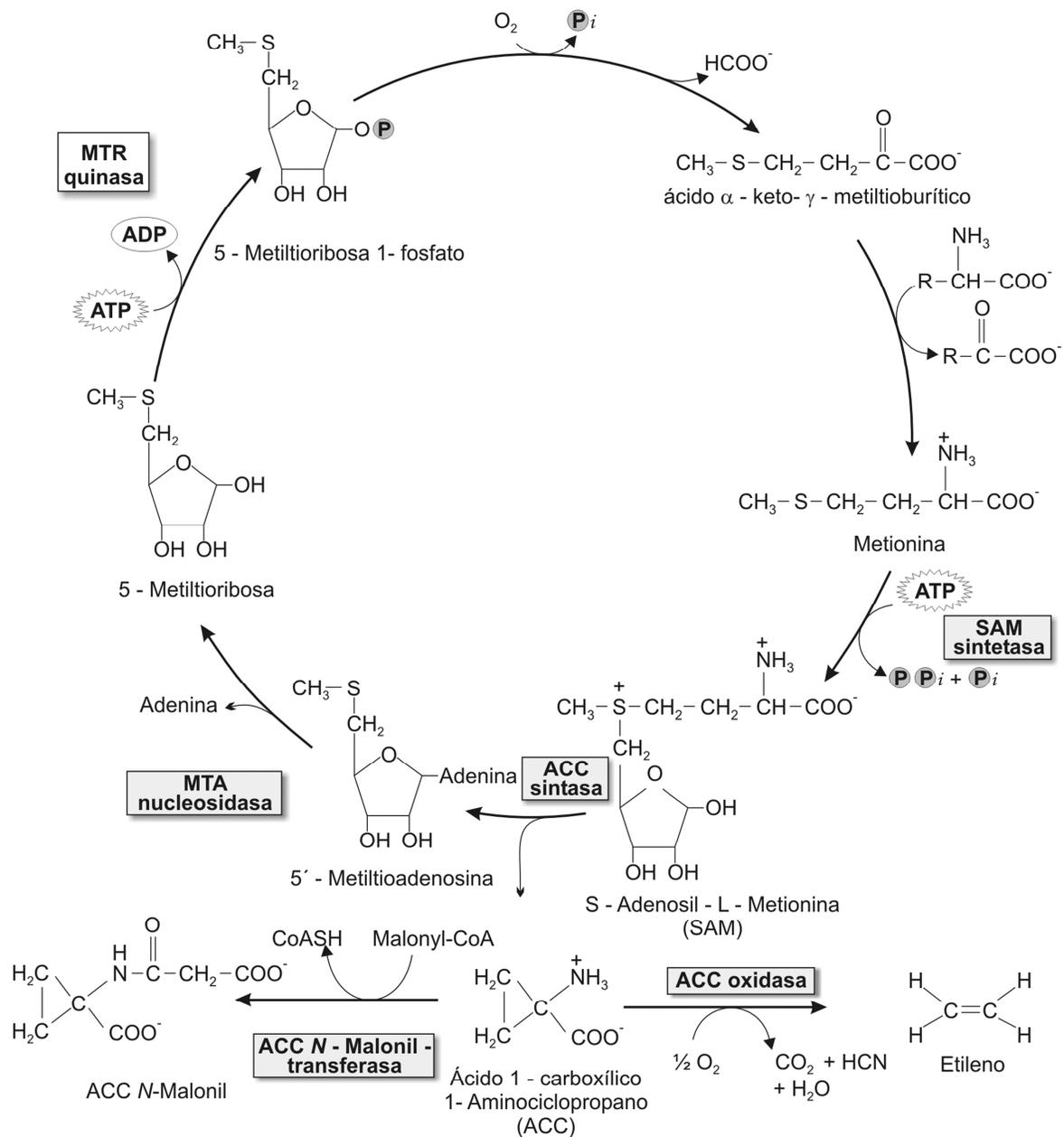


Figura 2: Biosíntesis y regulación del etileno (SAM: S-adenosilmetionina; ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxílico; MTR: metiltioribosa; MTA: metiltioadenosina; ATP: Adenosina trifosfato; ADP: Adenosin difosfato; CoA, CoASH; Coenzima A; Crozier et al., 2000).

2.2.1.1. Metionina. La metionina es el principal precursor del etileno; el C₁ de su molécula se convierte en CO₂, el CO₂ en ácido fórmico y los C₃ y C₄ constituyen la olefina (Mathooko, 1996). La metionina es también un metabolito fundamental en las células vegetales ya que es requerido para la síntesis de proteínas y, a través de su primer metabolito S-adenosilmetionina (SAM), se derivan varios metabolitos clave, tales como etileno, poliaminas y biotina (**Figura 3**) (Amir, 2010), por lo que los niveles de metionina son altamente regulados. Estudios *in vitro* e *in vivo* indican que el nivel de metionina en plantas de Arabidopsis es regulado principalmente por la enzima cistationina- γ -sintasa (CGS, por sus siglas en inglés) (Hesse y Hoefgen, 2003). Estudios realizados en tomate sugieren que la expresión del gene de esta enzima es regulada por el etileno (Katz et al., 2006).

El nivel de metionina libre es uno de los factores limitantes en la biosíntesis de etileno en tomate. Estos niveles varían dependiendo del estado de madurez del fruto, observándose valores de 20, 40 y 30 nmol/g peso seco, en los estados de madurez verde maduro, rosa y rojo, respectivamente. El incremento masivo de la producción de etileno durante la maduración de frutos de tomate reduce significativamente las reservas de metionina, por lo que se requiere un incremento en la síntesis *de novo* de este aminoácido a través de la regulación de la expresión del gen que codifica para la enzima CGS (Katz et al., 2006).

La síntesis *de novo* de metionina involucra la liberación de adenina, que posteriormente sufre una carboxilación para formar el aminoácido (Cruz et al., 2010). Una vez que la metionina está presente, el sistema funciona durante el tiempo que dure el suministro de ATP. La porción del carbono 4 de la metionina, desde la cual se deriva el ACC, es suministrada por la porción de la ribosa a SAM vía el ATP, mientras que el CH₃-S- de la metionina es conservado para la regeneración continua de este aminoácido (Abeles et al., 1992).

Como donante de grupos metilo, la metionina a través de SAM regula los procesos celulares esenciales, tales como la división celular, síntesis de la pared celular, síntesis de clorofila y síntesis de la membrana (Amir, 2010).

2.2.1.2. S-adenosil-metionina (SAM). El primer paso en la biosíntesis del etileno (Figura 3) es la formación de un compuesto muy inestable que es la S-adenosil-metionina (SAM) por medio de una reacción dependiente de ATP (Plich, 2013). Este compuesto suministra grupos metilos y es clave en la ruta metabólica ya que puede derivarse en ácido 1-amino-ciclopropano-carboxílico (ACC), o bien desviarse para sintetizar poliaminas.

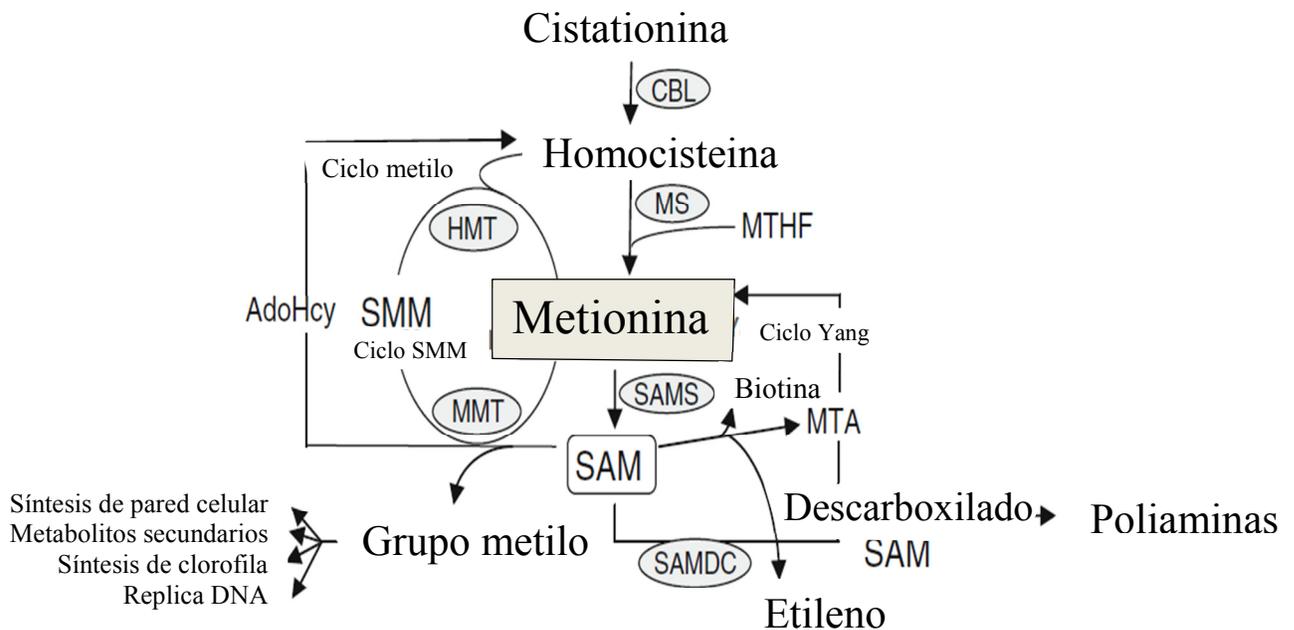


Figura 3. Biosíntesis de la Metionina (CBL: cistationa β -liasa; MS: metionina sintasa; SAM: S-adenosilmetionina; SAMS: SAM sintasa; SAMDC: SAM descarboxilasa; MTA: metil-tioribosa; MMT: metionina S-metiltransferasa; SMM: S-metilmetionina; HMT: homocisteína S-metiltransferasa; Amir, 2010).

El ACC es el precursor inmediato del etileno, que además de convertirse en etileno es a veces metabolizado hacia el ácido 1-malonilaminociclopropano-1-carboxílico (MACC o malonil-ACC) (Jiao et al., 1986).

La SAM (S-adenosil-L-metionina) juega un papel importante en varias reacciones bioquímicas de las plantas (Van de Poel et al., 2010). SAM es un intermediario clave en el metabolismo de la metionina, sirve como una fuente de grupos metileno (para la síntesis de ácidos grasos con sustituyentes ciclopropilo), grupos amino (en la síntesis de biotina), los grupos isopropilamino (en la síntesis de poliaminas y, también, en la síntesis de etileno, utilizado por las plantas para promover la maduración). También sirve como una fuente de átomos de azufre en la síntesis de la biotina y el ácido lipóico (Brosnan y Brosnan, 2006).

Por otra parte, SAM es la fuente del grupo propilamino en la síntesis de las poliaminas espermidina y la espermina, las cuales juegan un papel crucial en muchos aspectos del crecimiento de la planta, incluyendo la proliferación y diferenciación celular, la apoptosis, la homeostasis y la expresión génica (Amir, 2010).

2.2.1.3. 1-Amino-ciclopropano-carboxilato (ACC) sintasa. La ACC sintasa cataliza la conversión de SAM al ácido 1-amino-ciclopropano-carboxílico (ACC). Además de ACC, produce 5'-metiltioadenosina, la cual es utilizada para la síntesis de nueva metionina vía el ciclo modificado de metionina (Kende, 1993). La ACC sintasa es una enzima soluble con una masa molecular de 55 a 57 kDa. Se ha purificado la enzima en homogenizado de pericarpio de tomate y por electroforesis en gel de dos dimensiones se ha identificado como una proteína de 50 kDa. Esta enzima requiere de fosfato de piridoxal para su máxima actividad. La actividad de ACC sintasa es muy baja en tejidos que producen bajas cantidades de etileno y ésta aumenta bajo condiciones que promueven la formación de etileno (Chae y Kieber, 2005). Su pH óptimo es de 8.5 y su punto

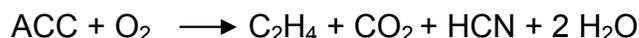
isoelectrónico es de 6.6 a 6.9. La ACC sintasa es inhibida por aminoetoxivinilglicina (AVG) y ácido aminooxiacético. (Kende, 1993; Acaster y Kende, 1983; Yang, 1980; Yu et al., 1980). Esta enzima es codificada por pequeñas familias multigénicas. Se ha reportado que la biosíntesis de etileno es regulada por tres miembros diferentes de la familia de genes que codifican para la ACC sintasa: (a) *LE-ACS2* y *LE-ACS4* son los genes dominantes responsables de la producción de etileno del sistema 2 en la maduración de los frutos de tomate y su expresión es regulada por un mecanismo de retroalimentación positiva, (b) el gen *LE-ACS6* es responsable de las bajas velocidades de producción de etileno en el sistema 1 y es negativamente regulada en fruta preclimática, y (c) los genes *LE-ACS1A* y *LE-ACS3* son también responsables de la producción de etileno en el sistema 1 preclimático. La producción de etileno cambia al sistema 2 en el estado climático, debido a la síntesis de los ARNm de *LE-ACS2*, *LE-ACS4*, *LE-ACO1* y *LE-ACO4*, como un resultado de una regulación de retroalimentación positiva (Nakatsuka et al., 1998).

La expresión de la ACC sintasa es diferencialmente regulada por diversos estímulos, una herida en el tejido del fruto puede causar el aumento de la actividad de la ACC sintasa (Acaster y Kende, 1983; Bleecker et al., 1988).

2.2.1.4. Ácido 1-amino-ciclopropano-carboxílico (ACC). El ACC es el precursor inmediato del etileno, que además de convertirse en etileno es a veces metabolizado hacia el ácido 1-malonilaminociclopropano-1-carboxílico (MACC o malonil-ACC) (Jiao et al., 1986). La producción de ACC es considerada como el paso limitante en la síntesis del etileno. Este se obtiene de la eliminación del grupo 5-metil-tioadenosina por la enzima ACC sintasa. Esta enzima tiene piridoxal fosfato como cofactor y puede inhibirse competitivamente con aminoetoxivinil-glicina (AVG) y ácido amino-oxaiacético (AOA) (Mathooko, 1996). El CO₂ a concentraciones de 0-20 kPa puede limitar la formación de ACC, inhibiendo la conversión de ACC a etileno (de Wild et al., 2005). El nivel de ACC libre se reduce de manera irreversible por la acción de ACC malonil transferasa,

regulando la producción de la olefina (Mathooko, 1996). En condiciones normales, los niveles de ACC son bajos pero se incrementan durante la maduración de los frutos. Su síntesis puede ser estimulada por daños, estrés, ataque de patógenos, entre otros (Wills et al., 1998).

2.2.1.5. 1-Amino-ciclopropano-carboxilato (ACC) oxidasa. En el paso final, el ACC es oxidado por la enzima ACC oxidasa para formar etileno. Esta reacción de oxidación requiere la presencia de oxígeno, y bajos niveles de dióxido de carbono (cerca de 1%) para activar a la enzima, de acuerdo a la siguiente ecuación:



En esta reacción el etileno se deriva del C-2 y C-3, el CO₂ del grupo carboxilo y el HCN del C-1 y del grupo amino del ACC. El HCN es destoxificado a β-cianoalanina, el cual, es metabolizado más tarde a asparagina o γ-glutamyl-β-cianoalanina. Esta ruta de destoxificación previene la acumulación de HCN, aún en plantas con altas velocidades de biosíntesis de etileno. La cinética de la interacción de la ACC oxidasa con el O₂ y ACC indica que la reacción sigue un mecanismo ordenado de enlace en donde la enzima se liga primero al O₂ y después al ACC. Además de ser convertido el ACC a etileno, también es metabolizado al ácido 1-(malonilamino) ciclopropano-1-carboxílico (MACC). La malonilación es irreversible en condiciones fisiológicas, pero se ha reportado conversión de MACC a ACC bajo estrés hídrico o senescencia en hojas de tabaco y flores de claveles, respectivamente. La malonilación del ACC puede contribuir a la regulación de los niveles de ACC y de la velocidad de formación de etileno (Kende, 1993).

Los niveles bajos de O₂ incrementan la concentración de ACC, reduciendo la autocatálisis de etileno y limitando el aumento en la actividad de ACC sintasa (Riquelme et al., 1999). El CO₂ es un modulador que estimula su

actividad a la vez que promueve la síntesis de la enzima, pero a concentraciones elevadas (5-10%) inhibe su acción. La actividad de la ACC oxidasa se ha asociado con la integridad de membranas celulares (Abeles et al., 1992). Sin embargo, con la identificación del gene que codifica esta enzima en frutos de tomate (Hamilton et al., 1990; 1991), se demostró que esta actividad es en realidad dependiente del ácido ascórbico y de iones Fe^{2+} como cofactores de la reacción (Ververidis y John, 1991). Estas observaciones han facilitado el aislamiento y caracterización de la ACC oxidasa en tejidos de varias especies, por lo que se sugiere que la enzima puede actuar como una monooxigenasa que requiere ascorbato como donador de hidrógeno, oxígeno y Fe^{2+} (Fernández-Maculet et al., 1992). Dado que el nivel de actividad de la ACC oxidasa usualmente se encuentra en exceso del que necesitan muchos tejidos, esto puede reflejarse en un incremento sustancial de actividad en maduración de frutos y en respuesta a la exposición a etileno (Cruz et al., 2010).

2.1.2. Activación del etileno

Algunas de las respuestas que se producen en los frutos por el etileno abarcan maduración, incluyendo síntesis de pigmentos como las antocianinas y degradación de clorofila, respiración y senescencia (Saltveit, 1999). Estos efectos generalmente implican incremento en la síntesis de varias enzimas. El etileno se relaciona con la actividad de enzimas involucradas con el ablandamiento o degradación de la pared celular, así como su propia biosíntesis. En algunos casos aumenta la cantidad de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que codifica para dichas enzimas y estimula la transcripción de varios genes del núcleo (Yokotani et al., 2009).

Los receptores de etileno regulan una serie de genes que se expresan durante la maduración, lo que se evidenció gracias a la identificación de los mutantes de tomate (Nr, nor, rin, Cnr, hp1 y hp2 por sus siglas en inglés). Siendo

el aislamiento del gen (Nr) durante la maduración el que identifico el primer receptor de etileno (Jeong et al., 2002; Giovannoni, 2004). El complejo se activa por el arreglo en los ligandos, presumiblemente histidina y cisteína, cuando el etileno se disocia del metal (Sisler y Serek, 1999). Como respuesta, se estimula la liberación de un segundo mensajero al material genético que se traducirá en las proteínas de respuesta (Reid, 1992). Los iones plata, CO₂, y olefinas cíclicas compiten por el sitio activo del receptor, inhibiendo la acción de este gas (Sisler y Serek, 1997).

2.1.3. Inhibición

El problema de inhibir, o por lo menos retrasar el proceso de envejecimiento del material vegetal, es un tema que requiere especial atención en la agricultura (Plich, 2003). Existen varias vías y tratamientos por los cuales se puede inhibir la síntesis o acción del etileno. Entre los inhibidores de la síntesis del etileno se encuentran la aminoetoxivinilglicina (AVG) y ácido aminooxiacético (AOA), los cuales bloquean la conversión SAM a ACC y son conocidos como inhibidores de la enzima ACC sintasa (Zacarías, 1993). También pueden ser inhibidas por ciertas concentraciones de auxinas y citocininas. El ión Cobalto (Co²⁺, bajas concentraciones de O₂ y altos niveles de CO₂, bloquean la conversión de ACC a etileno (Lau y Yang, 1976; Yu et al., 1980). La temperatura óptima para el paso de ACC a etileno catalizada por la ACC oxidasa está entre 15 y 25°C, temperaturas mayores a 35°C y debajo de 10°C inhiben la actividad de esta enzima (Lelièvre et al., 1997)

Otros compuestos que inhiben la conversión del ACC a etileno son las poliaminas (Suttle, 1981; Braam et al., 1996) que también reaccionan con los grupos –SH de proteínas si estos grupos están libres (Plich, 1993). Los análogos estructurales de ACC producen un efecto inhibitorio marcado, por ejemplo el ácido α-aminoisobutírico (AIBA) (Satoh y Esashi, 1983).

Además de estos compuestos para inhibir el etileno existen ciertas sustancias, las cuales influyen no solo sobre la síntesis del etileno sino en su acción sobre los tejidos. Es decir, que actúan en los receptores del etileno o en su ruta de transmisión de la señal, así como en el uso de ion de cobalto (Lau y Yang, 1976). Compuestos volátiles como el trans-cicloocteno y cis-cicloocteno son inhibidores competitivos del receptor de etileno (Sisler et al., 1990). El 1-metilciclopropeno (1-MCP: C₄H₆) inhibe también los receptores de etileno y ha demostrado ser particularmente efectivo (Watkins et al., 2000). Otros compuestos que también han mostrado una inhibición en la síntesis de etileno son el 2,4-dinitrofenol (Yu et al., 1980), y el bencil isotiocianato (Patil y Tang, 1974).

2.2. Isotiocianatos

Los isotiocianatos son sustancias producidas por varias plantas pertenecientes a la familia de las *Brassicaceae*, *Capparaceae* y *Caricaceae* como un sistema de defensa contra el ataque de patógenos (Tiznado y Troncoso, 2006). Los isotiocianatos son compuestos que contienen azufre en su molécula (Khokon et al., 2011). Su formación se origina cuando la degradación de los glucosinolatos se lleva a cabo en condiciones alcalinas o neutras por la enzima mirosinasa (**Figura 4**) (Delaquis y Mazza, 1995).

2.2.1. Estructura química

Los isotiocianatos están formados por la sustitución de un sulfuro por un oxígeno en el grupo isocianato R-N=C=S. Las propiedades fisicoquímicas y la actividad biológica de los isotiocianatos derivan de la hidrólisis de los glucosinolatos los cuales son en gran medida, determinados por la estructura de la cadena lateral (Wittstock y Halkier, 2002).

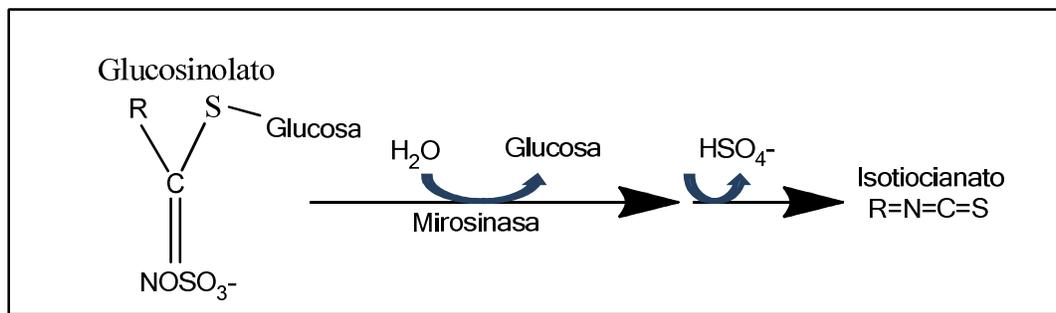


Figura 4: Hidrólisis del glucosinolato.

Es posible obtener un amplio espectro de isotiocianatos, dependiendo del grupo “R” presente en la molécula del glucosinolato (Rosa y Rodríguez, 1999). El grupo “R” unido al isotiocianato puede ser alifático, aromático o etéreo-aromático (Drobnica et al., 1967). En algunos casos estos compuestos son inestables y se descomponen rápidamente para formar una variedad de otros compuestos (Rosa y Rodríguez, 1999). Estos compuestos se localizan en las vacuolas de las células de las plantas pertenecientes a las familias de las *Brassicaceae*, *Capparaceae* y *Caricaceae* y pueden ser hidrolizados en la misma planta por enzimas citoplasmáticas hidrolíticas denominadas mirosinasas (Stoewsand, 1995).

2.2.2. Propiedades de los isotiocianatos

Los isotiocianatos son responsables del sabor picante de la mostaza, el rábano, la col, el brócoli, coliflor, wasabi, entre otros. Estos compuestos son considerados como aditivos alimentarios y generalmente se consideran seguros para el consumo humano (Kermanshai et al., 2001; Masuda et al., 1999; Shin et al., 2004). Estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de vegetales del género Brassica (brócoli, calabazas, coliflor, coles de Bruselas, col rizada, nabos

y berzas) se asocia con una disminución en el riesgo de cáncer en diversos tejidos como colon, recto, tiroides, pulmón, entre otros (Mitthen et al., 2000; Galan et al., 2004; Keuma et al., 2004; Fimognari et al., 2012).

Los isotiocianatos presentan una gran diversidad química, son biodegradables, inocuos para la salud humana y tienen un amplio espectro biocida (Delaquis y Mazza, 1995). Se ha demostrado que tienen una actividad inhibitoria contra hongos (Troncoso et al., 2005), nematodos (Buskov et al., 2002; Zasada y Ferris, 2003), bacterias (Hashem y Wahba, 2000), insectos (Tsao, et al., 2002; Agrawal y Kurashige, 2003) y malezas (Petersen et al., 2001). Además, se ha reportado su capacidad antioxidante (Wang et al., 2010), y su posible efecto inhibitorio en la producción de etileno (Patil y Tang, 1974; Troncoso et al., 2005).

En un estudio realizado por Patil y Tang (1974), se evaluó el efecto de 4 diferentes concentraciones (0.023, 0.046, 0.092 y 0.184 mM) de bencil isotiocianato sobre la producción de etileno en discos de frutos de papaya. Asimismo, se evaluó la evolución del etileno en los discos 3 horas después de la aplicación del compuesto. Los autores observaron que la aplicación de 0.046 mM de bencil ITC causó un 60% de inhibición de la producción de etileno; mientras que la aplicación de 0.092 y 0.184 mM causaron un 80% de inhibición. En cambio, la producción de etileno en los discos 3 horas después de la aplicación de bencil ITC, fue muy similar a la observada en el testigo, observándose del 3 al 8%, de inhibición de la producción de etileno a las concentraciones de 0.184 y 0.092 mM, respectivamente. Los autores sugieren que la inhibición de la producción de etileno por el bencil isotiocianato ocurre en el sistema productor del etileno más que sobre la evolución o recuperación de este gas después de que el sistema es inducido, sugiriendo que es posible que el compuesto inhibe la síntesis de enzimas involucradas en la biosíntesis del etileno. En tomate, en un estudio realizado por Troncoso et al., (2005) se evaluó el efecto del bencil ITC en la producción de etileno y actividad de ACC en frutos inoculados con *Alternaria alternata*. En este estudio se utilizaron frutos de tomate

bola en estado de madurez rojo. Los autores reportaron que además del efecto antimicótico se observó que el bencil isotiocianato aplicado a una concentración de 0.56 mg/L (5.64 μ M) durante 36 horas, redujo significativamente la producción de etileno. Asimismo en un estudio similar realizado en el laboratorio, se observó que la aplicación de alil ITC a una concentración de 0.56 mg/L por el mismo tiempo a frutos de tomate, se redujo significativamente la producción de etileno y hubo una inhibición total en los niveles de la actividad de la enzima ACC oxidasa (Troncoso et al., 2005). Estos estudios sugieren la posible participación de los isotiocianatos en la inhibición de la síntesis de etileno.

2.2.3. Mecanismo de acción

La actividad biológica de los isotiocianatos es debido a su capacidad para reaccionar con el grupo amino de los aminoácidos que forman tioureas y con los grupos tiol dando lugar a derivados de N-aliltio-carbamoil (o ditiocarbamatos) (Cejpek et al., 2000; Nakamura et al., 2009). Evidencias experimentales sugieren que la acción de los isotiocianatos en los organismos vivos puede ser debido a reacciones inespecíficas con cualquier proteína de los mismos. Esto es debido a una posible interacción no específica y covalente del grupo isotiocianato ($-N=C=S$) con los grupos sulfhidrilo ($-SH$), grupos amino y los enlaces disulfuro en proteínas y amino ácidos (Kawakishi y Kaneko, 1987; Brown y Morra, 1997).

Evidencias experimentales indican que el isotiocianato puede reaccionar con el grupo épsilon-amino de la lisina y el grupo fenólico de los residuos de tirosina de la proteína 12S de mostaza, lo que resulta en un notable incremento en la movilidad electroforética (Murthy y Rao, 1986). También se ha propuesto que el grupo $-SH$ de la cisteína puede ser otro objetivo del isotiocianato. En este caso, cuando ocurre la reacción con un residuo de cisteína que se encuentre localizado en el sitio activo de la enzima, la actividad enzimática se puede perder. Estas hipótesis se apoyan en un experimento en el que las proteínas

bromelina, papaína, tripsina, y α - quimotripsina se hicieron reaccionar con el bencil isotiocianato. En este experimento, se observó que ese compuesto reaccionó con el grupo sulfhidrilo de los residuos de cisteína presentes en todas las enzimas, con excepción de la tripsina. Después de la reacción, los isotiocianatos permanecen unidos covalentemente a la proteína lo que trae cambios en su estructura terciaria que conduce a una menor solubilidad de la misma, cambios en su punto isoeléctrico y a una pérdida parcial o total de la actividad enzimática (Rawel et al., 1998; Yang et al., 2000).

Recientemente Nakamura et al., (2009) evaluaron la reactividad del 2-propenil isotiocianato (alil isotiocianato, AITC) con lisina en una proteína en condiciones neutras. Estos autores confirmaron la formación de un aducto entre el ITC - amino con lisina en condiciones fisiológicas (**Figura 5**). En base a lo anterior, los autores proponen un posible mecanismo de reacción de los isotiocianatos con residuos de cisteína y lisina en el cual ocurre una reacción reversible de los residuos de cisteína con el grupo sulfhidrilo mediante un enlace disulfuro; así mismo ocurre una reacción irreversible de los residuos de lisina con el grupo amino, mediante un enlace amino que forma un producto estable (Nakamura et al., 2009).

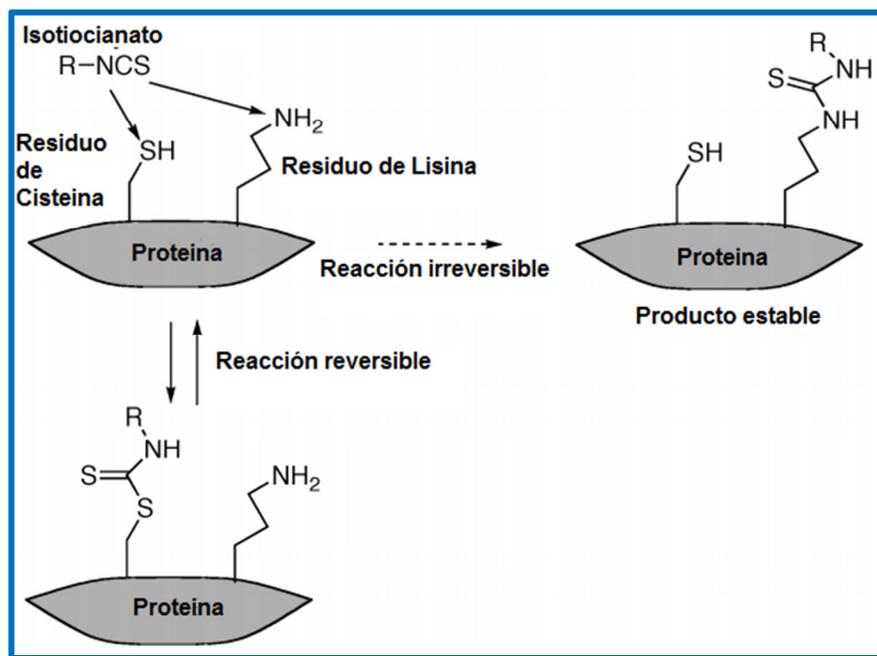
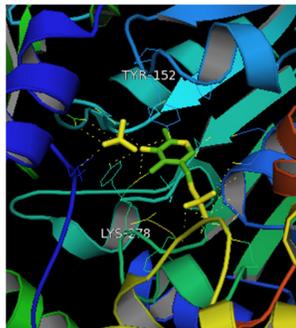


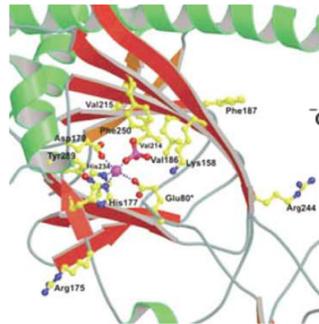
Figura 5. Posible mecanismo de reacción de los isotiocianatos con cisteína y lisina en condiciones fisiológicas.

Se ha reportado que tanto ACC sintasa como ACC oxidasa presentan en su sitio activo residuos de lisina; mientras que en el caso de SAM se ha reportado la presencia de residuos de cisteína (Pesis et al., 1995; Zhang et al., 2004; Nakamura et al., 2009) (**Figura 6**). Por lo que es posible que los

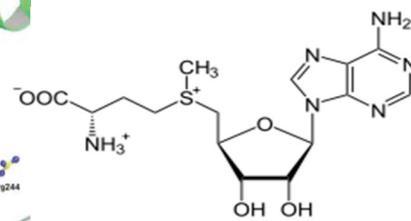
isotiocianatos pudieran reaccionar con los residuos azufrados de estas enzimas y metabolito afectando la producción de etileno.



ACC sintasa



ACC oxidasa



SAM

Figura 6. Enzimas y metabolito participantes en la síntesis de etileno (Capitani et al., 1999; Zhang et al., 2004).

3. HIPOTESIS

La aplicación de isotiocianatos en frutos de tomate reduce la síntesis de etileno debido a su posible interacción en la ruta biosintética.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de los isotiocianatos en la síntesis de etileno en tomate.

4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar el efecto del alil isotiocianato y bencil isotiocianato, a diferentes concentraciones y tiempos de exposición sobre la producción de etileno de frutos de tomate.
- ✓ Determinar el efecto del alil isotiocianato y bencil isotiocianato, a diferentes concentraciones y tiempos de exposición en el contenido de metionina, S-adenosil-metionina (SAM) y ácido 1-amino-ciclopropano-carboxílico a diferentes tiempos posterior a la exposición.
- ✓ Determinar el efecto del alil isotiocianato y bencil isotiocianato, a diferentes concentraciones y tiempos de exposición sobre los niveles de actividad de las enzimas 1-Amino-ciclopropano-carboxilato sintasa (ACCs) y 1-Amino-ciclopropano-carboxilato oxidasa (ACCo).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Selección de Frutos

Los frutos de tomate tipo “bola” fueron obtenidos del mercado de abastos “Francisco I. Madero”, localizado en Hermosillo, Son. Se trasladaron al laboratorio donde se seleccionaron frutos libres de daños y en base a uniformidad en tamaño, forma y color. Se utilizó el color como un indicador del estado de madurez, seleccionándose aquellos que presentaran un color rosa, indicativo del estado de madurez 4 de acuerdo a la clasificación de color reportado por la USDA (USDA, 2012).

5.1.1 Color

El color se determinó en el pericarpio de los frutos en tres puntos diferentes del fruto en cinco frutos por tratamiento. Se usó un colorímetro MINOLTA CR-300 y se tomaron las lecturas de L^* , a^* y b^* . Los resultados se expresaron como Croma que es la pureza o saturación del color, calculándose con la fórmula $C = (a_2^2 + b_2^2)^{1/2}$ y el ángulo de matiz (AM) que es el tono del color ya sea rojo-púrpura, amarillo, azul-verde, y azul, y que se calculó con la fórmula $AM = \arctan b^*/a^*$ (McGuire, 1992).

5.1.2. Determinación de la producción de etileno

Los frutos se colocaron individualmente en frascos de plástico en un sistema cerrado. Los frascos se sellaron con parafilm y se colocaron en una cámara a 20°C por 1 h antes de realizar la determinación. Las muestras se prepararon por quintuplicado. De cada frasco se tomó una muestra de 1 mL de gas del espacio de cabeza y se inyectó a un cromatógrafo de gases (VARIAN STAR 3400 CX, Palo Alto, CA), equipado con una columna Hayasep N (2 m x 2.03 cm de diámetro interno) y con un detector de ionización de flama.

La concentración de etileno se reportó en μL de etileno $\text{kg}^{-1}\text{-h}^{-1}$ de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\mu\text{LC}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1}\text{-h}^{-1} = \frac{\text{Spa} \times \text{Stc} \times \text{hs}}{\text{Stpa} \times \text{w} \times \text{t}}$$

Dónde:

Spa= Área de la muestra; Stc= concentración del estándar (μL); hs= Volumen del espacio de cabeza (L); Stpa= Área del estándar; W= Peso de la muestra (Kg); t= Tiempo de incubación de la muestra (h).

5.2 Etapa 1: Determinación del Efecto de los Isotiocianatos en la Producción de Etileno

Una vez seleccionados los frutos, se colocó un fruto dentro de una bolsa de polietileno de baja densidad (PEBD, 100 μm de grosor, 15 x 25 cm). Se aplicaron diferentes dosis de isotiocianatos, tanto de alil como de bencil a concentraciones de (0, 0.1, 0.5, 1.0 y 2.0 mM), sobre círculos de papel filtro.

Posteriormente se colocó el papel filtro dentro de un vaso de precipitado, y finalmente se colocó el vaso de precipitado + papel filtro en el interior de la bolsa de plástico conteniendo el fruto de tomate. Se cerró la bolsa con una selladora manual y se colocó a 20 °C, permitiendo la liberación de los compuestos volátiles durante 0, 6, 12 y 24 h.

5.2.1. Determinación de la producción de etileno

Al término de cada tiempo de exposición los frutos se sacaron de las bolsas de PEBD y se colocaron individualmente en frascos de plástico en un sistema cerrado. La determinación se realizó siguiendo la técnica descrita en el apartado 5.1.2.

5.3 Etapa 2: Determinación del Efecto del Isotiocianato en la Biosíntesis de Etileno en Frutos de Tomate

Una vez determinado el tratamiento en el cual se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición de la producción de etileno, se seleccionaron frutos de tomate con características similares a las de la primera etapa y se aplicó el tratamiento con isotiocianato. Una vez terminado el tiempo de exposición al isotiocianato, los frutos se sacaron de las bolsas de PEBD y se colocaron a 20 °C por 24 horas. Durante ese periodo se realizaron muestreos a las 0, 3, 6, y 24 h para la determinación del efecto del isotiocianato en el contenido de metionina, SAM, ACC y producción de etileno, así como en los niveles de actividad de las enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa.

5.3.1 Determinación de metionina

La determinación de metionina se realizó por el método del o-phthalaldehído (OPA) por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). Este método se basó en la técnica modificada por Vázquez et al., (1997).

5.3.1.1 Extracción. Se tomaron 5 g de muestra fresca previamente picada y se mezclaron con 5 mL de ácido tricloroacético al 7.5%. Posterior a esto se homogenizó la muestra en un homogenizador Ultra Turrax (IKA, Alemania) durante 2 min. Se colocó la muestra homogenizada en un tubo de centrifuga de 50 mL y se tapó perfectamente, todo esto a 4°C. Se centrifugó por 30 min a 3211 g a 4°C. Terminada la centrifugación, se filtró la muestra a través de papel Whatman # 4. Se realizó un segundo filtrado mediante una membrana de PVDF 0.2 µm para solventes (Millipore). El filtrado se almacenó en refrigeración en viales de 2 mL color ámbar tipo ABC, con septa PTFE/Silicón, hasta la cuantificación por HPLC.

5.3.1.2 Análisis de metionina. El análisis de metionina se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC) acoplado a un detector de fluorescencia (350 nm excitación y 450 nm emisión). Se utilizó una columna Agilent Zorbax Eclipse AAA de 150 mm x 4.6 mm diámetro interno, y 3.5 µm de partícula, conectada a una pre-columna Supelco C₁₈ de 1 cm x 4.6 mm diámetro interno con un tamaño de partícula de 5 µm. En la separación cromatográfica se utilizó un gradiente escalonado, con un flujo de 1.0 mL/min de 2 eluyentes (A: Buffer de acetatos, pH 7.2; B: Metanol). La metionina se identificó y cuantificó de acuerdo al tiempo de retención y áreas comparadas con un estándar comercial de metionina. Los resultados fueron reportados como nmol g⁻¹ p.f. (peso fresco).

5.3.2 Determinación de SAM (S-adenosil-metionina)

Para la determinación SAM se utilizó el método reportado por Van de Poel (2010), con modificaciones.

5.3.2.1 Extracción. Se tomaron 0.4 g de tejido liofilizado y se homogenizó con 1 mL de ácido tricloroacético al 5% w/v por 10 min a 4°C. El homogenizado se centrifugó por 15 min a 10 000 g a 4°C. El sobrenadante se centrifugó de nuevo por 15 min a 13 000 g. El segundo sobrenadante fue obtenido después de una filtración a través de un filtro de tamaño de poro de 45 µm. Todas las etapas se llevaron a cabo en hielo a 4°C para impedir la degradación de SAM.

5.3.2.2 Determinación por HPLC. Para la determinación de SAM se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC) acoplado a un detector UV visible (260 nm). Se utilizó una columna C₁₈ HP fase reversa de 250 mm x 0.3 diámetro interno, con un tamaño de partícula de 5 µm. Se inyectaron 20 µL de muestra, a un flujo de 0.5 mL min⁻¹ con buffer de acetato de sodio al 0.1 M (pH 4.5). La SAM se identificó y cuantificó de acuerdo al tiempo de retención y áreas comparadas con un estándar comercial de yoduro de SAM (Sigma, Chemical Co., St. Luis). Los resultados fueron reportados como nmol g⁻¹ p.f. (peso fresco).

5.3.3 Determinación de la actividad enzimática de ACC sintasa

La actividad de la ACC sintasa se determinó mediante el método reportado por Ke (2002), tomando 0.3 g de muestra previamente pulverizada con nitrógeno líquido. Se mezcló con 20 mL del buffer de extracción (buffer de fosfato, 250 mM, pH 8.0, fosfato de piridoxal 10 µM, EDTA 1 mM, ditioneitol (DTT) 5 mM). La muestra se agitó durante 30 min a 4°C en un agitador de alícuotas. Posteriormente se centrifugó a 15 000 g por 15 min, a 4°C. Se

tomaron 5 mL del sobrenadante y se mezclaron con 150 μL de SAM (1.2 mM). Después de 1 h de incubación, se detuvo la reacción con 100 μL de HgCl_2 . La generación de ACC se midió de acuerdo al método de Lizada y Yang (1979). Los resultados se reportaron como $\text{nmol g}^{-1} \text{ p.f. h}^{-1}$.

5.3.4 Determinación del contenido de ACC

Para el análisis del contenido de ACC, se utilizaron 3 repeticiones de 4 discos por tomate (aproximadamente 3 g) de cada uno de los tratamientos a los cuales previamente se les midió ACC oxidasa. El tejido congelado se trituró en un mortero con 5 mL de etanol al 80% y el extracto se centrifugó a 14 476 g durante 10 min. El sobrenadante se concentró en un rotoevaporador a 45°C hasta sequedad y el residuo se disolvió con 3 mL de agua desionizada.

El contenido de ACC se determinó en una alícuota del extracto acuoso, de acuerdo al método descrito por Lizada y Yang (1979). El ensayo se realizó de la siguiente manera: en tubos de vidrio de 14 mL inmersos en hielo, se introdujo una alícuota de 100 μL del extracto, 100 μL de HgCl_2 10 mM y 600 μL de agua desionizada. Los tubos se cerraron herméticamente con tapones de goma y se les inyectó 200 μL de una disolución de NAOH saturada e hipoclorito de sodio al 10% en una porción 1:2 (v/v). En un tubo réplica se añadieron 50 μL de una solución de ACC 0.125 $\mu\text{L mL}^{-1}$, restando este volumen del volumen de agua adicionada y se sometió al mismo procedimiento. Después de la adición de la solución oxidante, los tubos se agitaron y se incubaron en un baño de hielo durante 10-15 min. Para facilitar la reacción, los tubos se agitaron periódicamente. Posteriormente, se extrajo 1 mL del gas del espacio de cabeza de los tubos y se determinó la concentración de etileno. En los tubos a los que se les añadió estándar de ACC se les calculó el porcentaje de recuperación de la reacción para cada muestra y con dicho valor se determinó el contenido de ACC de los extractos. Los resultados fueron reportados como $\text{nmol g}^{-1} \text{ p.f.}$

5.3.5 Determinación de la actividad enzimática de ACC oxidasa

La actividad de ACC oxidasa “in vivo” se determinó de acuerdo al método reportado por Lizada y Yang, (1979). Se incubaron 10 discos de 8 mm de diámetro de tejido fresco durante 1 h en placas Petri conteniendo una solución de ACC 5 mM. En esta concentración de ACC, la capacidad de producción de etileno del tejido fue completamente saturada. Posteriormente, el tejido fue secado en papel filtro, se transfirió a unos tubos de vidrio de 40 mL que se cerraron herméticamente con tapones de goma y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Se extrajo 1 mL del gas del interior del tubo y la concentración de etileno se determinó como se mencionó previamente en la sección 5.1.2. Los resultados se reportaron como $\text{nmol g}^{-1} \text{ p.f. h}^{-1}$.

5.3.6. Determinación de la producción de etileno

Al término de cada tiempo de exposición a los isotiocianatos (0, 6, 12 y 24 h), los frutos se sacaron de las bolsas de PEBD y se colocaron individualmente en frascos de plástico en un sistema cerrado. Se determinó la producción de etileno siguiendo la técnica descrita en el apartado 5.1.2.

5.4 Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se empleó un diseño de experimentos completamente al azar en el cual los tratamientos tuvieron un arreglo factorial, de acuerdo a las siguientes etapas:

Etapa 1:

Para determinar el efecto de los compuestos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, sobre la producción de etileno en frutos de tomate, se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial $A \times B \times C$ ($2 \times 5 \times 4$), con 5 repeticiones, donde los factores y niveles fueron los siguientes:

Factor A= Tipo de compuesto con 2 niveles (alil y bencil isotiocianato).

Factor B= Concentración con 5 niveles (0, 0.1, 0.5, 1 y 2 mM).

Factor C= Tiempo de exposición con 4 niveles (0, 6, 12 y 24 h).

Etapa 2:

Para determinar el efecto del tratamiento seleccionado que redujo en mayor porcentaje la producción de etileno, sobre la ruta biosintética del compuesto, se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial $A \times B$ (2×4), con 5 repeticiones.

Factor A= Tratamientos con dos niveles: Tratamiento y testigo.

Factor B= Tiempo posterior a la exposición con 4 niveles (0, 3, 6 y 24 h).

Para determinar el efecto de los factores sobre las variables respuesta se realizó un análisis de varianza (ANOVA), y para establecer diferencias entre los tratamientos, se aplicó la prueba de rangos múltiples Tukey-Kramer con un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$), utilizando el paquete estadístico NCSS (Hintze, 2007

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Color y Producción de Etileno de los Frutos

El **Cuadro 2** presenta los resultados de color obtenidos en los frutos de tomate, observándose valores de L* y a* de 44.76 y 9.16, respectivamente, así como un ángulo de tono de 74.59, y una saturación de 33.54.

Cuadro 2. Color en los frutos de tomate seleccionados.

Parámetro	Media ± Error estándar
Color	
L*	44.76 ± 2.06
a*	9.16 ± 1.93
Croma o saturación	33.54 ± 1.21
Ángulo de tono (°Hue)	74.59 ± 2.17

Estos valores coinciden con los resultados reportados por López y Gómez (2004) quienes observaron para tomate rosa, valores de 31 y 78.1 en las variables de saturación y tono, respectivamente. De acuerdo a estos autores, el croma o saturación no es un buen indicador de la maduración en tomate, ya que

éste es esencialmente una expresión de la pureza o saturación de un solo color. Además, diferentes colores pueden presentar el mismo valor de saturación. En el caso del tomate, durante su maduración se presentan diferentes colores simultáneamente ya que la clorofila es degradada de verde a compuestos que van desde aquellos que no proporcionan color, al mismo tiempo que los carotenoides son sintetizados desde compuestos con poco color (fitoeno) a licopeno (rojo), β -caroteno (naranja) y xantofilas y carotenoides hidroxilados que proporcionan un color amarillo (Giuliano et al., 1993).

En el estudio realizado por López y Gómez (2004), se observó que los cambios más importantes en el color durante la maduración de tomate fueron en la variable a^* , la cual está relacionada con la degradación de clorofila y síntesis de licopeno. En ese estudio se obtuvieron valores entre -10 a 12 en la variable a^* , correspondiendo un valor de 8 para el tomate con coloración rosa. Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro estudio, en el que se obtuvo un valor promedio de 9.16 en esta variable. Sin embargo, para obtener un color más preciso se deben de incluir las tres variables de color. En ese sentido y de acuerdo a los cambios en coloración que ocurren durante la maduración del tomate, López y Gómez (2004) sugieren al ángulo de tono, el índice de color y la relación a^*/b^* como índices objetivos de madurez para tomates, sobre todo para aquellos que maduran en el huerto.

Adicionalmente, y de acuerdo a la producción de etileno a 20°C determinada en diferentes estados de madurez, los tomates de color rosa (estado de madurez 4 de acuerdo a la clasificación de color publicada por la USDA) presentaron una producción de etileno de 1.86 a 2.5 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Kader (2002) menciona que los frutos de tomate producen entre 1 a 10 μL de etileno $\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ a 20°C, por lo que los resultados obtenidos en este estudio se encuentran dentro de ese rango.

6.2. Etapa 1: Efecto de los Isotiocianatos en la Producción de Etileno en Frutos de Tomate.

La producción de etileno en los frutos de tomate se vio afectada por la exposición a los isotiocianatos. De acuerdo al análisis estadístico realizado, el tipo de compuesto tuvo un efecto significativo en la producción de este gas, observándose que la exposición al alil isotiocianato redujo en mayor porcentaje la producción de etileno (**Cuadro 3**). Asimismo, al comparar el efecto de las diferentes concentraciones de los isotiocianatos en la producción de este gas, se observó que éste fue significativamente menor en los frutos expuestos a la concentración de 0.5 mM. En cuanto al efecto de los tiempos de exposición a los isotiocianatos (0, 6, 12 y 24 horas), la producción de etileno fue menor estadísticamente en los frutos expuestos por 24 horas, independientemente del compuesto y de la concentración aplicada. Al comparar la combinación de los factores Compuesto x Concentración (AxB), se observó que la interacción fue significativa; mientras que las combinaciones entre los otros factores (AxC, BxC) no fueron significativas. Asimismo, la interacción triple de los tres factores resultó ser no significativa ($p \geq 0.05$), por lo que no se observaron diferencias significativas entre compuesto x concentración x tiempo de exposición.

6.2.1 Producción de etileno en tomates expuestos con Alil Isotiocianato

En la **Figura 7** se presentan los resultados del efecto del Alil isotiocianato en la producción de etileno en tomate. Como puede observarse los frutos expuestos al compuesto mostraron una producción de etileno entre 0.7 y 3.21 $\mu\text{L kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$; la cual fue menor que los frutos no expuestos (testigo), los cuales presentaron una producción entre 2.54 a 3.45 $\mu\text{L kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. El tratamiento que mostró una menor producción de etileno fue el fruto expuesto a una concentración de 0.5 mM por 6, 12 y 24 horas de exposición; mientras que los frutos expuestos a concentraciones mayores de AITC presentaron mayor producción de etileno. Sin embargo, y debido a que no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) en la interacción triple, en la **Figura 7** solo se muestran las tendencias que presentaron los tratamientos con respecto al tiempo.

Cuadro 3. Efecto de los isotiocianatos, concentración y tiempos de exposición en la producción de etileno en tomate a 20°C.^w

Factor	Nivel	Producción de etileno ($\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) ^x	
		Promedio ^y	Error estándar
A: Compuesto	AITC	1.13 ^b	0.125
	BITC	2.78 ^a	0.125
B: Concentración	0 mM	2.19 ^a	0.198
	0.1 mM	1.86 ^a	0.198
	0.5 mM	1.54 ^b	0.198
	1.0 mM	1.81 ^a	0.198
	2.0 mM	2.38 ^a	0.198
C: Tiempo	0 h	2.22 ^a	0.177
	6 h	2.35 ^a	0.177
	12 h	2.09 ^a	0.177
	24 h	1.16 ^b	0.177
Interacciones ^z			
AxB	*		
AxC	NS		
BxC	NS		
AxBxC	NS		

^w Resultados de acuerdo al análisis de varianza de dos vías realizado mediante el paquete estadístico NCSS (2007).

^x Promedios de 5 réplicas \pm Error estándar.

^y Diferentes literales por cada factor, indica que son diferentes significativamente ($p \geq 0.05$).

^z Interacciones: *: significativa; NS: no significativa.

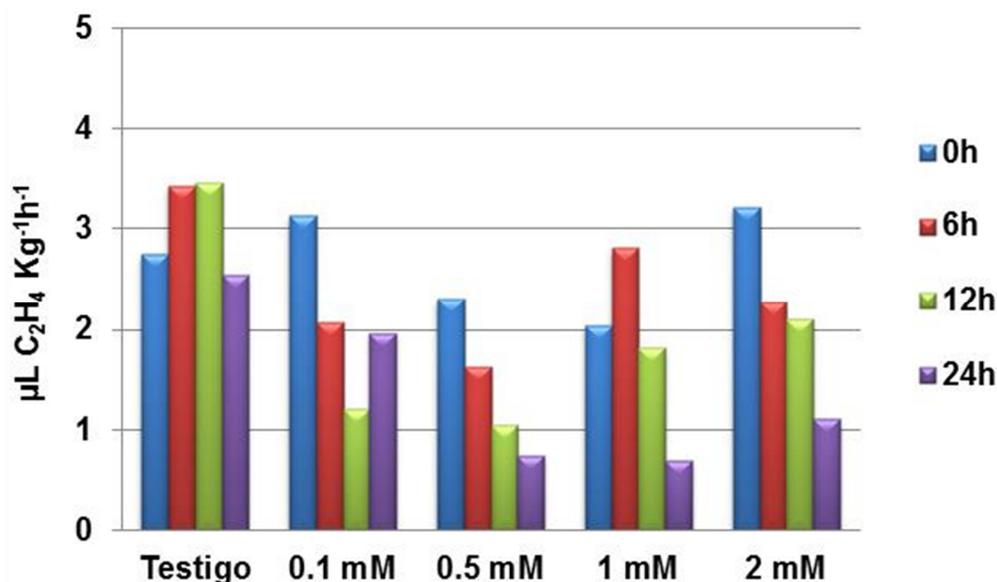


Figura 7. Producción de etileno en tomates expuestos por diferentes tiempos y a distintas concentraciones de AITC a 20°C.

En este estudio se hipotetizaba que a mayor concentración del isotiocianato, la inhibición de la producción de etileno sería mayor; sin embargo no se obtuvo ese comportamiento. Se ha reportado que la síntesis de etileno puede ser inducida por varios tipos de estrés, como los daños mecánicos, químicos y metales, sequía, temperaturas extremas y el ataque por patógenos (Kende, 1993; Johnson y Ecker, 1998; Wang et al., 2002). Es posible que las concentraciones de 1 y 2 mM del AITC hayan provocado un estrés en el fruto y como respuesta a ello hubo un incremento en la producción de etileno.

En la **Figura 8** se presenta la producción de etileno en frutos de tomate expuestos a diferentes concentraciones de bencil isotiocianato. Como se puede observar, estos mostraron una producción de etileno entre 1.1 a 4.3 $\mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$, la cual fue mayor en comparación con los expuestos con AITC. Esto puede ser debido a que el tamaño de la molécula de bencil es más grande que la de alil por

lo que puede presentar una menor difusión hacia el interior de la célula y de esta forma afectar en menor grado la producción de etileno. Al igual que los frutos expuestos con AITC, la concentración de bencil que mostró menor producción de etileno fue de 0.5 mM con 0, 6 y 12 h de exposición. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

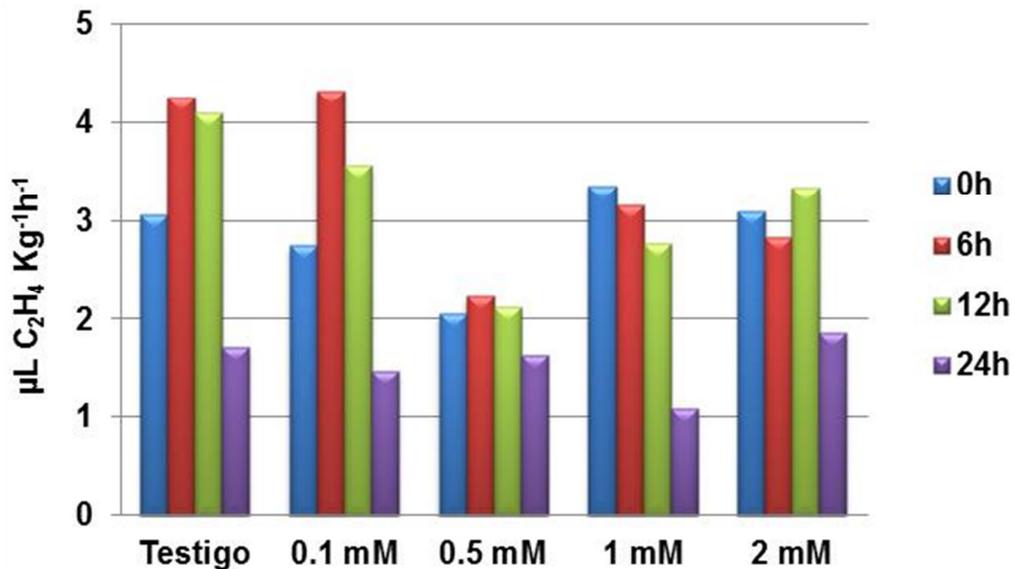


Figura 8. Producción de etileno en tomates expuestos por diferentes tiempos y a distintas concentraciones de BITC.

Con base en el análisis estadístico realizado y a las tendencias descritas anteriormente, se seleccionó el tratamiento que redujo en mayor cantidad la producción de etileno, el cual fue el AITC a una concentración de 0.5 mM expuesto por 6, 12 y 24 horas. A las 6 horas de exposición, se observó una reducción en la producción de etileno de 52.5%; mientras que a las 12 horas fue

de 69.9%. Estos porcentajes de inhibición en la producción de etileno concuerdan con los reportados por Patil y Tang, (1974) quienes mostraron que la aplicación de bencil isotiocianato en papaya redujo hasta un 60% la producción de ese gas.

En el caso de los frutos expuestos por 24 horas al AITC, todas las concentraciones presentaron daños en su superficie, como ablandamiento severo y desprendimiento de cutícula (Figura 9), por lo que este tratamiento no fue considerado para la segunda etapa del estudio. Es importante señalar que el color de los frutos testigo como los frutos expuestos al ITC fue similar al término del tiempo de exposición (Figura 9A y 9B); así como mencionar que además de los cambios mencionados anteriormente, también se observó que los frutos no expuestos (testigo) desarrollaron un color rojo intenso a los 8 días a 25°C post-tratamiento (Figura 9C); mientras que los frutos expuestos a los isotiocianatos permanecieron de color rosa (Figura 9D). A los 11 días a 25°C post-tratamiento, los frutos testigo presentaron ablandamiento y un color rojo más intenso; mientras que los expuestos permanecieron de color rosa (Figura 9E), presentaron ablandamiento con mayor desprendimiento de cutícula (Figura 9F) y en algunos casos hubo crecimiento de hongos.

El pigmento responsable de la coloración roja en tomate es el licopeno, el cual es el carotenoide más abundante en este fruto. Además de proporcionar el color rojo, el licopeno es importante desde el punto de vista nutricional, ya que se le ha considerado como un componente bioactivo alternativo para el tratamiento de las enfermedades crónicas, y de ciertos tipos de cáncer (Story et al., 2010; Ford y Erdman Jr, 2012).

La exposición del tomate al compuesto alil isotiocianato por 24 horas, provocó que éste no desarrollara el color rojo característico, por lo que se

sugiere que el alil isotiocianato puede estar inhibiendo la síntesis del licopeno, mediante la interacción del compuesto con enzimas participantes en su síntesis, como podrían ser la 1-deoxy-D-xilulosa 5-fosfato sintasa, fitoeno sintasa o la zeta caroteno desaturasa (Lois et al., 2000). Otra posible razón es la interacción del alil isotiocianato con la estructura del licopeno. Se ha reportado que los isotiocianatos pueden provocar efectos genotóxicos, induciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (Kassie et al., 2000; Mi et al., 2011). Estas especies pudieran ser captadas por el antioxidante licopeno, disminuyendo de esa forma la cantidad de licopeno en el fruto y por tanto afectando su coloración roja. Por otra parte, se ha reportado una elevada correlación entre la producción de etileno y la acumulación de licopeno en tomate (Alba et al., 2005; Liu et al., 2012). En ese sentido, la falta de coloración roja en el tomate expuesto a alil isotiocianato puede ser debido a la disminución en la producción de etileno observada en este estudio. Sin embargo, se requiere realizar más estudios que permitan comprobar alguna de las hipótesis sugeridas.

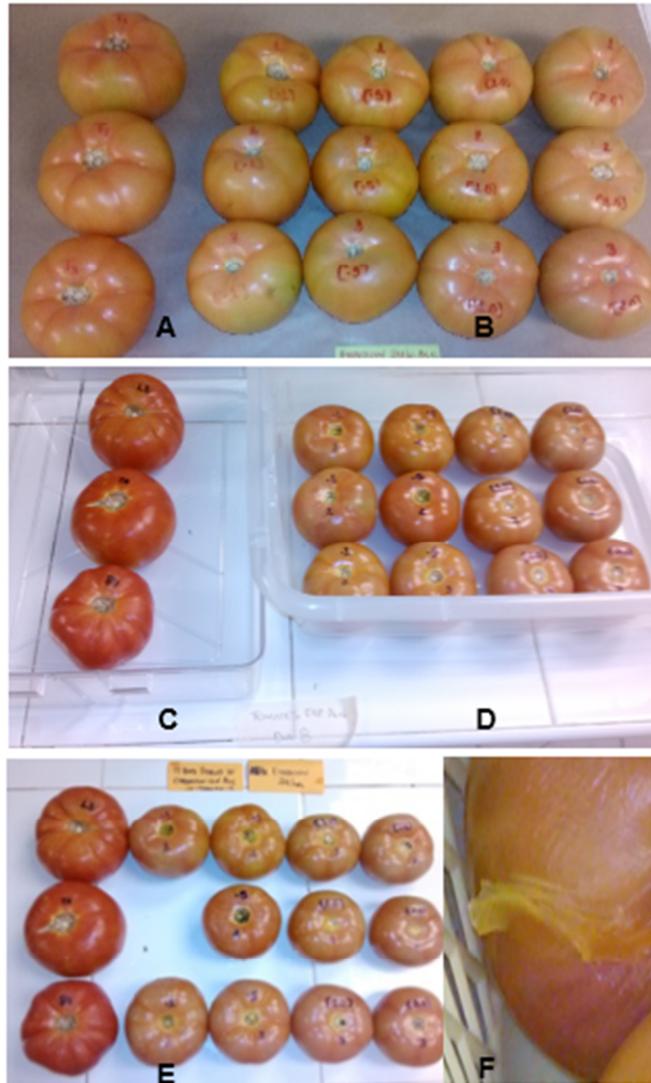


Figura 9. Cambios en la calidad visual de tomate almacenado a 25°C a los 0, 8 y 11 días posteriores a la exposición con AITC por 24 h (A: Testigo a los 0 días; B: frutos expuestos al AITC a los 0 días; C: Testigo a los 8 días post-tratamiento; D: frutos expuestos al AITC a los 8 días post-tratamiento; E: frutos expuestos al AITC a los 11 días post-tratamiento; F: desprendimiento de cutícula).

6.2 Etapa 2: Efecto del Alil Isotiocianato 0.5 mM sobre la Síntesis de Etileno en Tomate Expuesto por 6 y 12 horas

En base a los resultados obtenidos en la etapa anterior, se repitió la exposición de los tomates al AITC 0.5 mM por 6 y 12 h, con el fin de determinar el o los puntos de la síntesis de etileno afectados por el tratamiento.

La biosíntesis de etileno se ha estudiado intensamente en la fisiología de plantas. Se ha establecido que el precursor del etileno es la metionina, la cual es convertida a S-adenosil metionina (SAM). SAM y ACC son los precursores del etileno, siendo la ACC sintasa y ACC oxidasa las enzimas que catalizan esas reacciones (Zhang et al., 2004; Seymour et al., 2013; López et al., 2009). En ese sentido, en esta parte del estudio se determinó el efecto de la exposición por 6 y 12 h al AITC 0.5 mM sobre el contenido de metionina, SAM, contenido de ACC, los niveles de actividad de ACC sintasa y ACC oxidasa, y finalmente sobre la producción de etileno en frutos de tomate. Estos cambios se evaluaron durante 24 h (0, 3, 6 y 24 h) post-tratamiento a 20°C.

6.3.1 Contenido de metionina

El análisis de varianza realizado indicó un efecto significativo de los factores tratamiento y tiempo, así como la interacción de ambos tratamientos en el contenido de metionina de tomate. De acuerdo a este análisis, el contenido de este metabolito de tomate fue afectado por la exposición al alil isotiocianato, el cual fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) al ser expuesto por 12 horas con respecto al tiempo de exposición de 6 h y el testigo. Con respecto al factor

tiempo, el contenido de metionina fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) a las 24 h posterior a la exposición.

En la **Figura 10** se presenta el contenido de metionina en los frutos expuestos por 6 h y 12 h al AITC, con respecto al tiempo posterior a la exposición. Los frutos testigo presentaron un contenido de metionina entre 31 y 33 nmol g^{-1} p.f a las 0 y 24 h, respectivamente, valores que se mantuvieron constantes durante las 24 horas posteriores a la exposición. Estos valores fueron significativamente mayores con respecto a los frutos expuestos al alil isotiocianato. En esta figura se puede apreciar que el tomate al ser expuesto al AITC presentó una disminución en el contenido de metionina, la cual, en el caso del tratamiento AITC-6 h se mantuvo más o menos constante durante las 24 h post-tratamiento. En cambio, en el caso de los frutos expuestos por 12 h se puede apreciar una disminución significativa en el contenido de metionina a las 6 y 24 h posteriores a la exposición, con respecto a los otros tratamientos. En este tratamiento se observó un contenido mínimo de 7.07 nmol g^{-1} p.f. después de 24 h de exposición, correspondiendo a un 80.7% de reducción con respecto al testigo. El contenido de metionina obtenido en los frutos testigo a todos los tiempos posteriores a la exposición concuerdan con datos publicados por Katz et al., (2006), quienes reportaron un contenido o valores de metionina entre 30 y 40 nmol g^{-1} en frutos de tomate en estado de madurez rosa.

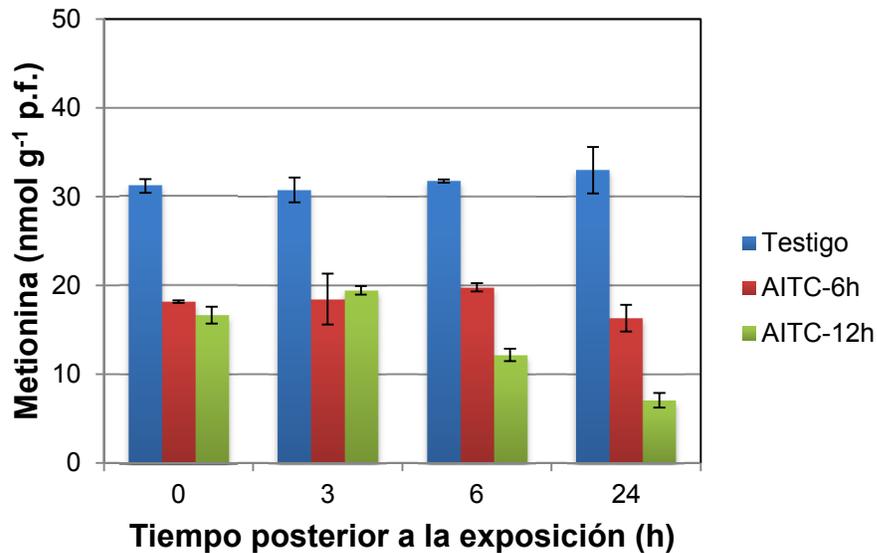


Figura 10. Contenido de metionina en tomates expuestos al AITC 0.5 mM por 6 y 12 h y evaluados durante 24 h a 20°C.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el AITC a la concentración de 0.5 mM y expuesto por 6 y 12 h redujo los niveles de metionina en frutos de tomate, en comparación con los no expuestos (testigo). Siendo los frutos expuestos por 12 h los que mostraron un menor contenido. Esta disminución en metionina, pudiera ser debida a que este aminoácido contiene azufre en su molécula el cual podría reaccionar con el AITC provocando una disminución en su contenido. Sin embargo se requieren de más estudios para comprobar esta hipótesis.

6.3.2 Contenido de S-Adenosil-L-metionina (SAM)

S-Adenosil-L-metionina es uno de los metabolitos precursores del etileno y es sintetizado a partir de metionina mediante la enzima SAM sintetasa (Van de

Poel et al., 2013). Los resultados obtenidos en este estudio indican que al igual que en la metionina, el contenido de este metabolito en tomate fue afectado por la exposición por 6 y 12 h al alil isotiocianato a una concentración de 0.5 mM. De acuerdo al análisis estadístico realizado, hubo un efecto significativo de los factores tratamiento y tiempo; así como también en la interacción entre ambos factores sobre el contenido de SAM. Los frutos expuestos al AITC presentaron un contenido de SAM significativamente menor con respecto al testigo; mientras que en los frutos expuestos por 6 h y 12 h no hubo diferencias significativas entre ellos. En cuanto al factor tiempo posterior a la exposición, también se observó un efecto significativo sobre la variable SAM, indicando que el valor más bajo de este metabolito fue registrado a las 24 h post-tratamiento.

La **Figura 11** muestra los resultados del efecto de la exposición por 6 y 12 h al AITC 0.5 mM sobre el contenido de SAM de tomate evaluado durante 24 h a 20°C. Como puede apreciarse, los frutos testigo presentaron un mayor contenido de SAM (87.8 a 153.3 nmol g⁻¹ p.f.), con respecto a los frutos expuestos al AITC. Estos valores altos fueron observados principalmente durante las primeras 6 h post-tratamiento, registrándose una disminución significativa a las 24 h de evaluación. En cambio, los frutos expuestos con AITC presentaron un contenido de SAM entre 30 y 130 nmol g⁻¹ p.f., los cuales fueron menores estadísticamente con respecto al testigo.

Asimismo, se observaron cambios en el contenido de SAM durante las 24 horas de evaluación posteriores a la exposición con el alil isotiocianato. Al tiempo cero (inmediatamente después del tiempo de exposición), los frutos expuestos al AITC por 6 y 12 horas presentaron una disminución significativa en el contenido de SAM, la cual fue equivalente al 43 y 59%, respectivamente. Sin embargo, en la figura se puede apreciar que a las 6 horas de evaluación el contenido de SAM en los frutos tratados fue muy similar al observado en el

testigo, sugiriendo una pérdida del efecto del alil isotiocianato y una recuperación en la síntesis de este metabolito. A las 24 h se observa nuevamente una disminución, esto puede ser debido a que SAM contiene en su molécula cisteína y se ha reportado que los isotiocianatos reaccionan con residuos de cisteína de forma reversible (Nakamura et al., 2009), pudiendo ser esta interacción la causa de la disminución.

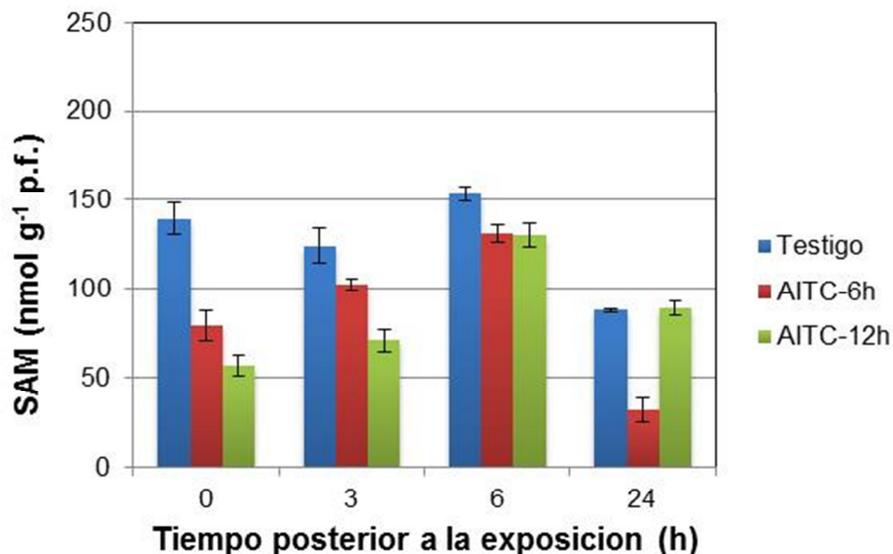


Figura 11. Contenido de SAM de tomate expuesto por 6 y 12 h al AITC 0.5 mM y evaluado durante 24 h a 20°C.

Los estudios que evalúan el contenido de SAM en vegetales o frutas y hortalizas son escasos. Van de Poel et al., (2010), determinaron la cantidad de SAM utilizando el ácido tricloroacético como método de extracción. Los autores obtuvieron un contenido de SAM de alrededor de 90 nmol g⁻¹ p.f. en tejido de tomate, los cuales están en el rango de los valores obtenidos en nuestro estudio. SAM es sintetizada a partir de la metionina y ATP y la reacción es catalizada por

la enzima SAM sintetasa (Roje, 2006). Este metabolito es un sustrato común para varias reacciones bioquímicas en plantas. Las tres rutas más importantes en las cuales participa SAM son la biosíntesis de poliaminas, de etileno y las reacciones de trans-metilación que ocurren en el ciclo de Yang. En frutos climatéricos como el tomate, SAM presenta un papel importante debido al incremento autocatalítico en la producción de etileno durante la maduración del fruto, por lo que se sugiere la necesidad de un metabolismo de reciclaje eficiente por el ciclo de Yang para hacer frente a esta gran demanda de consumo de metionina (Roje, 2006).

Como se mencionó anteriormente, la metionina es requerida tanto para la síntesis de proteínas como para la síntesis de SAM; sin embargo, aún no es claro cuánto y cuándo se utiliza la metionina para cada una de estas síntesis (Amir, 2010). En este estudio, los resultados del contenido de SAM no coinciden con los resultados del contenido de metionina. Al tiempo cero después de la exposición con el alil isotiocianato, el contenido de SAM en los frutos tratados fue significativamente menor con respecto al testigo, el cual fue en aumento hasta las 6 h post-tratamiento, y finalmente disminuyó a las 24 h posterior a la exposición. Mientras que el contenido de metionina fue muy similar durante las primeras 6 h posteriores al tratamiento y también disminuyó a las 24 h posteriores a la exposición. Es posible que el alil isotiocianato haya reaccionado con la enzima SAM sintetasa inhibiendo la síntesis de SAM, inhibición que fue más evidente inmediatamente después de la exposición al compuesto, y esta inhibición fue mucho menor a las 6 h posteriores al tratamiento, indicando una pérdida del efecto del AITC y el restablecimiento del contenido de SAM. Por otra parte, es posible que el AITC haya reaccionado directamente con la molécula de SAM. Se ha reportado que la S-adenosil-metionina presenta en su estructura residuos de cisteína (Pesis et al., 1995; Zhang et al., 2004), los cuales pueden

reaccionar en forma reversible con el grupo funcional del isotiocianato (Nakamura et al., 2009). Sin embargo, se requiere realizar estudios futuros que permitan comprobar la interacción de los isotiocianatos con la enzima SAM sintetasa, o con la molécula de SAM.

6.3.3 Actividad de ACC sintasa (ACCs)

El siguiente paso en la biosíntesis de etileno es la conversión de SAM a ACC mediante la enzima ACC sintasa (S-adenosil-L-metionina metiltioadenosina-liasa, EC4.4.14). Al igual que en el contenido de SAM, el análisis estadístico realizado mostró un efecto significativo en los distintos factores (Tratamiento y tiempo post-tratamiento), así como también en la interacción AxB sobre los niveles de actividad de la enzima ACC sintasa. Al analizar el factor tratamiento se pudo observar que los frutos expuestos con alil isotiocianato presentaron niveles de actividad de ACCs significativamente menores con respecto al testigo, registrándose el nivel de actividad enzimática más bajo en los frutos expuestos al alil isotiocianato por 6 horas. En cuanto a los tiempos posteriores a la exposición, los frutos evaluados a los tiempos de 0 y 3 h presentaron los niveles más bajos significativamente comparados con los tiempos de 6 y 24 h.

En la **Figura 12** se presentan los resultados de la actividad de ACCs en tomate expuesto por 6 y 12 h al AITC y evaluados durante 24 h a 20°C. Se puede observar que durante las primeras 6 h posteriores a la exposición, los frutos testigo presentaron niveles de actividad constantes (9.03 a 9.68 nmol g⁻¹ p.f. h⁻¹), mostrando un incremento en la actividad de la enzima a las 24 h después de la exposición. En cambio, en los frutos expuestos al AITC, el nivel

de actividad de la enzima fue significativamente menor al tiempo cero, observándose una disminución en el nivel de actividad del 50 y 63% en AITC-6h y AITC-12h, respectivamente. A las 6 h posteriores a la exposición, se observó un incremento significativo en el nivel de actividad para ambos tratamientos, alcanzando valores de 7.28 y 8.9 $\text{nmol g}^{-1} \text{ p.f. h}^{-1}$ para AITC-6h y AITC-12h, respectivamente, los cuales fueron muy cercanos a los registrados en el testigo (9.68 $\text{nmol g}^{-1} \text{ p.f. h}^{-1}$). En los frutos tratados, los niveles de actividad se mantuvieron constantes a las 24 h post-tratamiento.

Hong et al., (2004) reportaron un nivel máximo de la actividad de ACCs de 6 $\text{nmol g}^{-1} \text{ p.f. h}^{-1}$, en tomate de coloración rosa. Zhao et al., (2013), evaluaron los niveles de ACC sintasa en tomate cv 'Lichun' producido también bajo invernadero, observándose niveles de esta enzima menores a 20 $\text{nmol g}^{-1} \text{ p.f. h}^{-1}$ en tomate verde maduro. Como puede observarse, los niveles de la actividad de ACCs son diferentes dependiendo de la variedad, estado de madurez y condiciones de cultivo del tomate.

El comportamiento en los niveles de actividad de ACC sintasa, es muy similar al observado en el contenido de SAM, principalmente durante las primeras 6 horas de evaluación. Al igual que en el contenido de SAM, el nivel de actividad de ACCs al tiempo cero fue significativamente menor con respecto al testigo. Sin embargo, el nivel de actividad fue aumentando hasta alcanzar a las 6 horas posteriores a la exposición, un nivel de actividad muy similar al registrado en el testigo, lo cual sugiere el restablecimiento casi total de la actividad de ACCs a ese tiempo.

Este comportamiento puede ser debido a que al exponer los frutos al alil isotiocianato, éste reaccionó con los residuos de lisina presentes en el sitio activo de la enzima ACC sintasa, inhibiendo su actividad. Sin embargo, al

retirarse los frutos de la exposición al compuesto la actividad de la enzima se restableció. Nakamura et al., (2009) proponen un posible mecanismo de reacción de los isotiocianatos con residuos de cisteína y lisina en el cual ocurre una reacción reversible de los residuos de cisteína con el grupo sulfhidrilo mediante un enlace disulfuro; así mismo ocurre una reacción irreversible de los residuos de lisina con el grupo amino, mediante un enlace amino que forma un producto estable. En ese sentido, al observarse en este estudio un incremento en el nivel de actividad de la ACC sintasa, puede ser debido a que esté ocurriendo una síntesis *de novo* de la enzima, lo cual coincide con lo reportado por Ke et al., (2002) y Wang et al., (2002), quienes mencionan que el incremento en la actividad de ACC sintasa puede ser inducida por varios compuestos como el ácido indolacético y el ácido salicílico. Sin embargo, es necesario realizar estudios futuros que permitan comprobar esta hipótesis.

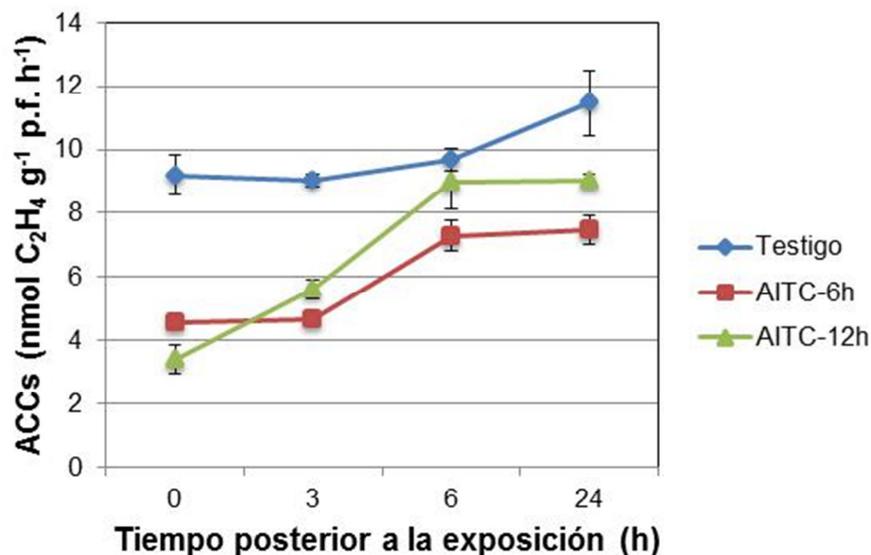


Figura 12. Actividad de ACCs de tomate expuesto por 6 y 12 h al AITC 0.5 mM y evaluado durante 24 h a 20°C.

6.3.4 Contenido de Ácido 1-Aminociclopropano 1-carboxílico (ACC)

El ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico es sintetizado a partir de SAM por acción de la enzima ACC sintasa (Barry y Giovannoni, 2007; Seymour et al., 2013; Wang et al., 2002). En este estudio, tanto el contenido de SAM como el nivel de actividad de la ACC sintasa fueron afectados por la exposición al alil isotiocianato a una concentración de 0.5 mM. El análisis estadístico realizado indicó un efecto significativo del factor tratamiento sobre el contenido de ACC de tomate, observándose que el tratamiento con alil isotiocianato produjo una disminución significativa en el contenido de ACC con respecto al testigo. En cambio, en el factor tiempo no se observó un efecto significativo sobre este metabolito.

En la **Figura 13** se muestra el contenido de ACC en tomate expuesto por 6 y 12 h al AITC 0.5 mM y evaluado durante 24 h a 20°C. Como se puede apreciar, los frutos testigo presentaron un contenido de ACC significativamente mayor con respecto a los frutos tratados por 6 y 12 h al tiempo 0 posterior a la exposición. Observándose una disminución mayor en los frutos expuestos por 12 h, los frutos expuestos al alil isotiocianato por 6 h, presentaron un contenido de ACC similar durante las primeras 6 horas de evaluación, mostrándose a las 24 h un contenido de ACC muy similar al testigo. En este tratamiento, el contenido de ACC fue significativamente menor que el testigo pero significativamente mayor que en los frutos expuestos por 12 h, únicamente al tiempo cero de evaluación, es decir, inmediatamente después de la exposición al compuesto. En cambio, en los frutos expuestos al tratamiento AITC-12 h, el contenido de ACC presentó un comportamiento diferente al de los frutos testigo y expuestos por 6 horas. En este caso, durante las primeras 6 horas de evaluación, el contenido de ACC fue significativamente menor con respecto a los otros tratamientos, observándose al

tiempo cero el valor más bajo con un 78% de inhibición en el contenido de este metabolito, con respecto al testigo. Al transcurrir el tiempo de evaluación, el contenido de ACC fue en aumento hasta registrar a las 24 horas posteriores a la exposición, un contenido de ACC similar al registrado en el testigo. A este tiempo, no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre tratamientos, lo cual indica que el contenido de ACC se restableció después de 24 horas de exposición al compuesto.

Estos valores se encuentran dentro del rango reportado durante la maduración de tomate (de tomate verde maduro a rojo) por Hoffman y Yang, (1980), quienes reportaron un contenido de ACC de 0 a 7.5 nmol g⁻¹ p.f. Asimismo, Tuomainen et al., (1997) reportaron un contenido de ACC de alrededor de 2 nmol g⁻¹ p.f. en frutos de tomate.

En general, los resultados obtenidos en el contenido de ACC en los frutos expuestos por 12 h, indican que éstos fueron menores con respecto al tiempo de exposición de 6 h, observándose al tiempo 0 un contenido de ACC de 0.71 nmol g⁻¹ p.f.; que corresponde a un 66.8% de disminución con respecto al tiempo de exposición de 6 h.

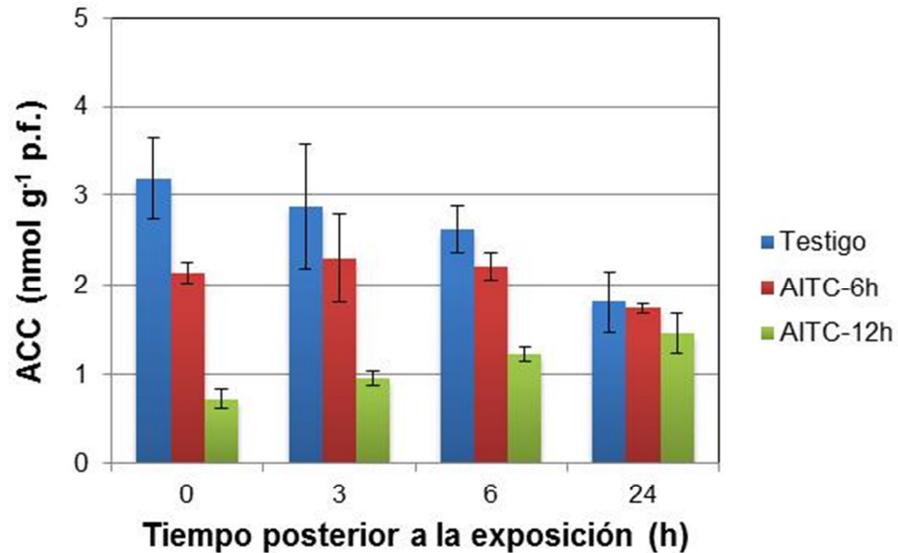


Figura 13. Contenido de ACC en tomate expuesto por 6 y 12 h al AITC 0.5 mM y evaluados durante 24 h a 20°C.

Hoffman y Yang (1980), reportaron que en frutos de tomate los niveles de ACC fueron bajos (alrededor de 1 nmol g⁻¹) y permanecieron constantes antes del climaterio; mientras que la producción de etileno continuó su incremento hasta el estado de madurez 5, color rojo según la USDA. Los autores observaron un contenido de ACC elevado al inicio del estudio, por lo que sugieren que esto puede deberse a la síntesis *de novo* de la enzima ACC sintasa. Además señalan que una disminución en el nivel de ACC indica que la velocidad de producción de etileno es mayor que la velocidad de síntesis de ACC. Estos resultados coinciden con los observados en nuestro estudio, en el que se observaron valores de ACC altos al inicio de las evaluaciones y disminuyeron significativamente a las 24 horas post-tratamiento.

6.3.5 Actividad de ACC oxidasa (ACCo)

El último paso en la biosíntesis del etileno es la oxidación del ACC por la enzima ACC oxidasa en presencia de oxígeno para formar el etileno, CO₂ y cianuro (Wang et al., 2002). Esta enzima al igual que la ACC sintasa, son claves en la síntesis de etileno, por lo que resulta importante determinar si esta enzima también fue afectada por la exposición al alil isotiocianato

El análisis estadístico realizado indica que hubo un efecto significativo del tratamiento en el nivel de actividad de ACCo; mientras que el efecto del tiempo y la interacción entre ambos factores no fueron significativos. Los frutos de tomate expuestos al alil isotiocianato por 6 y 12 h presentaron niveles de actividad de la ACCo significativamente menores con respecto al testigo.

En la **Figura 14**, se presentan los niveles de actividad de la enzima ACC oxidasa en frutos de tomate expuestos por 6 y 12 h al AITC 0.5 mM y evaluados durante 24 h a 20°C. Se puede apreciar que los frutos no expuestos (testigo) presentaron niveles de actividad de ACCo muy similares durante las 24 horas de evaluación. Estos niveles estuvieron en un rango de 3.92 a 4.27 nmol g⁻¹.h⁻¹. En cambio, los frutos expuestos al AITC, presentaron niveles de actividad de 0.42 a 0.77 y de 0.24 a 0.25 nmol g⁻¹.h⁻¹ a las 6 y 12 h, respectivamente, los cuales fueron menores estadísticamente con respecto al testigo. Estos niveles de actividad se mantuvieron casi constantes durante las 24 h de evaluación, es decir no se observó una recuperación de la actividad, contrario a lo que se observó en el contenido de SAM, ACC y en el nivel de la ACC sintasa. Los niveles de actividad observados en los frutos expuestos al alil isotiocianato por 12 h, representaron una disminución de la actividad enzimática del 94.4%.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Troncoso et al., (2005), quienes observaron una inhibición de casi el 100% en la actividad de ACCo de tomate al exponer los frutos a una concentración de 5.64 μM del alil isotiocianato durante 12 días a 20°C.

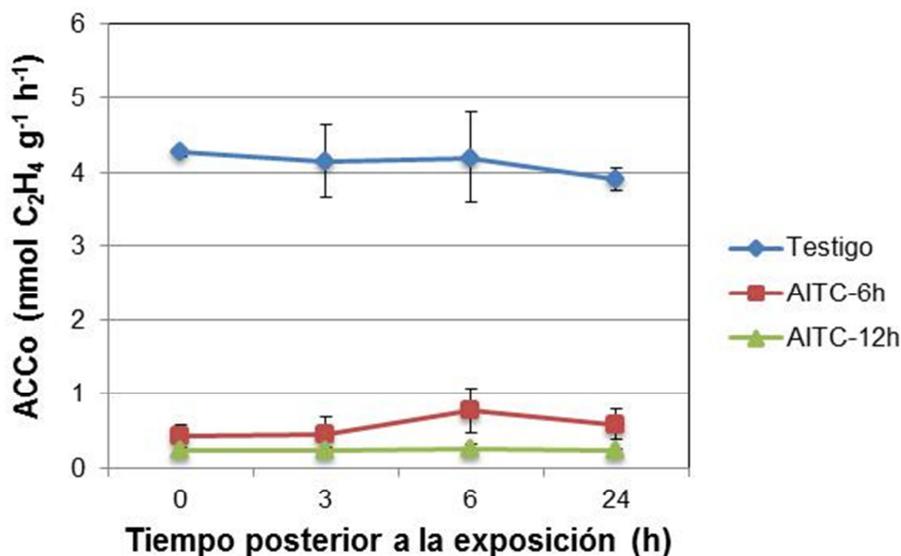


Figura 14. Actividad de ACCo en tomate expuesto por 6 y 12 h al AITC 0.5 mM y evaluados durante 24 h a 20°C.

Estudios previos reportan que los niveles de actividad de ACC oxidasa en tomate son muy bajos. Van de Poel et al., (2012) mencionan que durante el preclimaterio la actividad de esta enzima aumenta, mientras que la actividad de la ACC sintasa disminuye. Cuando el fruto se encuentra en estado verde maduro, la actividad de la ACC oxidasa se encuentra por debajo de 1 $\text{nmol mg proteína}^{-1}$. Una vez que el fruto inicia su maduración la actividad de ambas enzimas se incrementa de 2 a 3 veces, encontrándose en tomates en estado de

madurez rosa valores de actividad de 2.5 nmol mg proteína⁻¹.h⁻¹ (Nakatsuka et al., 1998) y de 1.5 nmol mg proteína⁻¹.h⁻¹ (Van de Poel et al., 2012). Esta actividad continúa incrementándose durante la maduración alcanzando valores de 5 nmol mg proteína⁻¹.h⁻¹ en tomate rojo maduro (Van de Poel et al., 2012). Cuando el fruto alcanza su máxima producción de etileno, el nivel de actividad de ACC oxidasa es de alrededor de 6 nmol mg proteína⁻¹ y posteriormente disminuye. Asimismo, se ha reportado que estos niveles generalmente se encuentran en exceso del nivel que se requiere en muchos tejidos (Saltveit, 1999). Estos resultados muestran que los niveles de actividad de ACC oxidasa son bajos en tomate y se encuentran en un rango de 0 a 10 nmol mg proteína⁻¹.h⁻¹; sin embargo, no pueden ser comparados con los resultados de nuestro estudio debido a que son unidades diferentes.

La exposición al alil isotiocianato afectó significativamente los niveles de actividad de la ACC oxidasa de tomate, inhibiéndolos en un 94% con respecto al testigo. Esta disminución en el nivel de actividad de ACC oxidasa puede ser debida a una posible interacción de la enzima con el isotiocianato. Evidencias experimentales indican que los isotiocianatos reaccionan con las proteínas, formando enlaces covalente con los grupos amino de la lisina (Nakamura et al., 2009). La ACC oxidasa contiene 28 residuos de lisina (Dong et al., 1992; Pesis et al., 1995; Zhang et al., 2004), por lo que los grupos amino libres de la lisina podrían reaccionar de forma irreversible con el alil isotiocianato disminuyendo el nivel de actividad de ACC oxidasa. Sin embargo, se requiere realizar estudios que permitan comprobar esta hipótesis.

6.3.6. Efecto del AITC 0.5 mM en la producción de etileno en tomate

El precursor inmediato del etileno es el ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC), el cual es oxidado por la ACC oxidasa para dar lugar a la formación del etileno. En este estudio se observó que cada uno de los metabolitos y enzimas involucradas en la síntesis de etileno (Metionina, SAM, ACC sintasa, ACC y ACC oxidasa) fueron afectados por la exposición al alil isotiocianato, por lo que se presume que también el etileno fue afectado por ese compuesto.

De acuerdo al análisis estadístico realizado, se pudo observar un efecto significativo sobre la producción de etileno entre tratamientos y tiempos de exposición al AITC; mientras que la interacción de ambos factores no fue significativa. Los frutos expuestos al AITC presentaron una producción de etileno significativamente menor con respecto al testigo. La producción de etileno observada en los frutos expuestos al AITC por 12 h fue significativamente menor con respecto a los frutos testigo y a los expuestos por 6 h. En el factor tiempo post-tratamiento, los frutos evaluados a las 0 y 3 h presentaron una producción de etileno significativamente menor con respecto a los otros tiempos.

En la **Figura 15** se presentan los resultados de la producción de etileno en tomate expuesto por 6 y 12 h al AITC 0.5 mM y evaluado durante 24 h a 20°C. Se puede apreciar que los frutos testigo presentaron una producción de etileno que se mantuvo más o menos constante durante el período de evaluación, lo cual coincide con los niveles de actividad de ACC oxidasa. Al tiempo cero se observó una producción de $3.95 \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, la cual se incrementó ligeramente durante las 24 h de evaluación hasta una producción de

4.27 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los tiempos de evaluación.

En el caso de los frutos expuestos al AITC, se observó una producción significativamente menor con respecto al testigo, observándose al tiempo 0 una disminución en la producción de etileno del 52.16 y 72.92% en los frutos expuestos a las 6 y 12 h, respectivamente. Estos porcentajes de inhibición son similares a los observados en la primera etapa de este estudio, lo cual nos indica una buena reproducibilidad del experimento.

En los frutos expuestos al AITC por 6 h se observó un aumento gradual en la producción de etileno al transcurrir el tiempo después de la exposición, hasta alcanzar una producción similar a la registrada en los frutos testigo. Estos frutos registraron una producción que fue estadísticamente igual al testigo, a las 6 y 24 h posteriores a la exposición, lo cual indica un restablecimiento de la producción de etileno en este tratamiento. En cambio, en los frutos expuestos al AITC por 12 h, aunque también presentaron un aumento en la producción de este gas, éste fue menor con respecto a la exposición al AITC por 6 h., alcanzando a las 24 h de evaluación, una producción de 2.69 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, la cual fue 37% menor con respecto a los frutos testigo.

La producción de etileno de tomate observada en este estudio, coincide con estudios publicados previamente por Kader (2002) quien reporta una producción de etileno entre 1 y 10 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; y por Hoffman y Yang (1980) quienes reportaron una producción de etileno de 1 a 7 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, durante la maduración de este fruto.

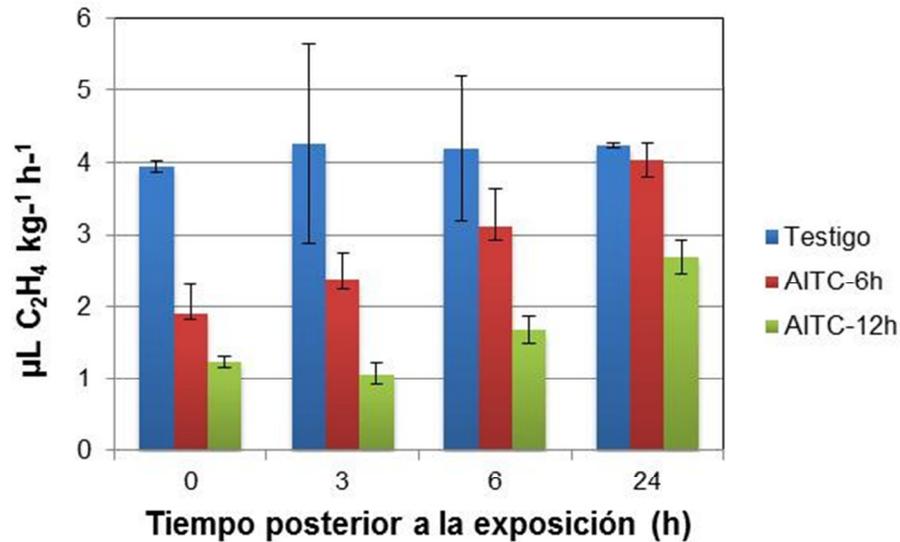


Figura 15. Producción de etileno en tomate expuesto por 6 y 12 h al AITC 0.5 mM y evaluado durante 24 h a 20°C

La producción de etileno está relacionada con el contenido de ACC y la actividad de la enzima ACC oxidasa, la cual oxida al ACC para dar lugar a la formación del etileno. En este estudio se observó que la actividad de esta enzima fue afectada por la exposición al alil isotiocianato, observándose niveles bajos de actividad de ACC oxidasa, entre 0 y 1 nmol g⁻¹ h⁻¹. A pesar de esos niveles bajos de la actividad, los tomates produjeron etileno. Estos resultados son similares a los publicados por Van de Poel et al., (2012) quienes reportaron en tomate estado verde maduro un nivel de actividad de ACC oxidasa por debajo de 1 nmol mg proteína⁻¹. Aun cuando las unidades son diferentes a nuestro estudio, lo importante en ese estudio es que a pesar de registrar ese nivel tan bajo en la actividad de la ACC oxidasa, se pudo observar un incremento en la producción de etileno, lo cual coincide con lo observado en nuestro estudio. Por lo que se sugiere que el etileno puede producirse aún con

niveles de actividad de ACC oxidasa muy bajos (por debajo de $1 \text{ nmol g}^{-1} \text{ p.f. h}^{-1}$).

El etileno es sintetizado a partir de Metionina, el cual es un metabolito que al parecer no es limitante en la síntesis de este compuesto, debido a que continuamente se acumula a través del desarrollo y maduración del fruto y se encuentra en suficientes cantidades (Van de Poel et al., 2012). Metionina se convierte a S-adenosil-metionina a través de la enzima SAM sintetasa. SAM y ACC son los precursores del etileno, siendo la ACC sintasa y ACC oxidasa las enzimas que catalizan esas reacciones. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, es claro que el alil isotiocianato produjo cambios en el contenido de los diferentes metabolitos y en el nivel de actividad de las enzimas evaluadas en este estudio (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Porcentaje de inhibición en los niveles de los diferentes metabolitos y enzimas participantes en la biosíntesis de etileno, de tomate expuesto al Alil isotiocianato 0.5 mM.

Metabolito/enzima	Porcentaje de inhibición (%)	
	6 h	12 h
Metionina (nmol g ⁻¹ p.f.)	50.52	78.57
SAM (nmol g ⁻¹ p.f.)	79.06	62.77
ACCs (nmol g ⁻¹ p.f. h ⁻¹)	50.33	62.94
ACC (nmol g ⁻¹ p.f.)	33.13	77.82
ACCo (nmol g ⁻¹ p.f. h ⁻¹)	81.97	94.4
Etileno (μL C ₂ H ₄ kg ⁻¹ .h ⁻¹)	52.16	72.92

Los diferentes metabolitos y enzimas evaluados presentaron contenidos y niveles significativamente menores con respecto al testigo, tanto a 6 h como a las 12 h de exposición, observándose en general, una mayor inhibición a las 12 h de exposición al compuesto, a excepción de SAM. Asimismo, la actividad de la enzima ACC oxidasa fue la más afectada por la exposición al alil isotiocianato.

Diversos autores han reportado que los isotiocianatos reaccionan de forma no específica con los grupos sulfhidrilo (-SH), grupos amino y los enlaces disulfuro en proteínas y amino ácidos (Kawakishi y Kaneko, 1987; Brown y Morra, 1997; Nakamura et al., 2009). Asimismo se ha reportado que los isotiocianatos reaccionan con las proteínas, formando enlaces covalente con los grupos amino de la lisina (Nakamura et al., 2009). La ACC oxidasa contiene 28 residuos de lisina (Dong et al., 1992), por lo que sus grupos amino podrían estar interaccionando con el alil isotiocianato y de esta forma afectar la actividad de la ACC oxidasa. En este caso, el nivel de actividad de la ACC oxidasa presentó el mayor porcentaje de inhibición, lo cual puede ser debido a que esta enzima se encuentra a nivel de membrana, por lo que está más expuesta a la interacción con el isotiocianato. Todas estas interacciones en su conjunto dieron como resultado una disminución en la producción de etileno en tomate.

7. CONCLUSIONES

La exposición de alil isotiocianato (AITC) a una concentración de 0.5 mM por un tiempo de 6, 12 y 24 horas, redujo en mayor porcentaje la producción de etileno de frutos de tomate en estado de madurez rosa.

La exposición por 24 h indujo un efecto negativo en la calidad visual de los frutos.

La exposición de tomate al alil isotiocianato 0.5 mM por 6 y 12 horas, disminuyó significativamente el contenido de Metionina, S-adenosil-metionina (SAM), y ácido 1-amino-ciclopropano-carboxílico (ACC).

La exposición de tomate al alil isotiocianato 0.5 mM por 6 y 12 horas, disminuyó significativamente los niveles de actividad de las enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa.

El tratamiento con alil isotiocianato 0.5 mM redujo de manera significativa la concentración de los metabolitos del ciclo de biosíntesis del etileno, así como la actividad enzimática de ACC sintasa y ACC oxidasa, lo cual provocó una disminución en la producción de etileno en frutos de tomate.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abeles, F., P. Morgan y J. Saltveit (1992). Ethylene in plant biology. Academic Press Inc. 2nd ed. San Diego 399 pp.

Abbott J. A. (2004). Textural quality assessment for fresh fruits and vegetables. *Quality of Fresh and Processed Foods* 542, 265–279.

Acaster, M. A. y H. Kende (1983). Properties and partial purification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Plant Physiology* 72 (1):139-145.

Agrawal, A. A. y N. S. Kurashige (2003). A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *pieris rapae*. *Journal of chemical ecology* 29(6):1403-1415.

Alba R, P. Payton, Z. Fei, R. McQuinn, P. Debbie, G. B. Martin, S. D. Tanksley, J. J. Giovannoni (2005). Transcriptoma and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *The Plant Cell* 17: 2954-2965.

Al-Falluji, R. A., D. H. Trinklein, V. N. Lambeth (1982). Inheritance of pericarp firmness in tomato by generation mean analysis. *Horticulturae Science* 17(5):763-764.

Amir, R. (2010). Current understanding of the factors regulating methionine content in vegetative tissues of higher plants. *Amino acids* 39(4):917-931.

Barry C. S., J. J. Giovannoni (2007). Ethylene and fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26: 143-159.

Bleecker, A. B., G. Robinson y H. Kende (1988). Studies on the regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato using monoclonal antibodies. *Planta* 173(3):385-390.

Braam, J., M. L. Sistrunk, D. H. Polisensky, W. Xu, M. M. Purugganan, D. M. Antosiewicz, P. Campbell y K. A. Johnson (1996). Life in a changing world: TCH

gene regulation of expression and responses to environmental signals. *Physiologia Plantarum* 98(4): 909-916.

Brecht, J. K. (1987). Locular gel formation in developing tomato fruit and the initiation of ethylene production. *Horticulturae Science* 22, 476–479.

Brosnan J. T. y M. E. Brosnan (2006). The sulfur-containing amino acids: an overview. *The Journal of nutrition* 136(6): 16365-16405.

Brown P. D. y M. J. Morra (1997) Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. *Advances in Agronomy*, 61: 167-231.

Brummell, D. A., V. D. Cin, C. H. Crisosto y J. M. Labavitch (2004). Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany* 55 (405): 2029-2039.

Brummell D. A., M. H. Harpster (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47, 311–340.

Buskov, S., B. Serra, E. Rosa, H. Sorensen y J. C. Sorensen (2002). Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* cv. Woll). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(4): 690-695.

Capitani, G., E. Hohenester, L. Feng, P. Sorici, J. F. Kirsch, J. N. Jansonius (1999). Structure of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in the biosynthesis of the plant hormone ethylene¹. *Journal of Molecular Biology*. 294(3): 745-756.

Cejpek, K., J. Valusek Y J. Velisek (2000). Reactions of allyl isothiocyanate with alanine, glycine, and several peptides in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8): 3560-3565.

Chae H. S., J. J. Kieber (2005). Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 10: 291-296.

Chaib J., M. F. Devaux, M. G. Grotte, K. Robini, M. Causse, M. Lahaye, I. Marty (2007). Physiological relationships among physical, sensory, and morphological attributes of texture in tomato fruits. *Journal of Experimental Botany*, 58(8): 1915-1925.

Cruz, J. D. I., G. Vela, L. Dorantes y H. S. García (2010). Efecto del etileno sobre el ACC y ACC oxidasa en la maduración de papaya 'maradol'. *Revista fitotecnia mexicana* 33(2): 133-140.

- Crozier A., Y. Kamiya, G. Bishop, T. Yokota (2000). Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. Capítulo 17, En: Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem, Russell L. Jones. (Ed). American Society of Plant Pathologists. USA. Pp. 897.
- Davis, U.C. (2013). Tomate: (Jitomate): Recomendaciones para mantener la calidad postcosecha. Postharvest Technology. Universidad de California.
- Davis J. M., R. G. Gardner (1994). Harvest maturity affects fruit yield, size, and grade of fresh-market tomato cultivars. Horticulturae Science, 29(6): 613-615.
- Delaquis, P. J. y G. Mazza (1995). Antimicrobial properties of isothiocyanates in food preservation. Food technology 49(11): 73-84.
- Domínguez, M. y M. Vendrell (1993). Ethylene biosynthesis in banana fruit: evolution of EFE activity and ACC levels in peel and pulp during ripening. Journal of Horticultural Science 68(1): 63-70
- Dong J. G., J. C. Fernandez y S. F. Yang (1992). Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. Proceedings of the National Academy of Sciences. 89: 9789-9793.
- Drobnica, L., M. Zemanova, P. Nemeč, K. Antos, P. Kristian, A. Martvon y E. Zavadská (1976). Antifungal activity of isothiocyanates and related compounds. American Society for Microbiology 16:582-587.
- FAO (2010). El cultivo protegido en clima mediterráneo. Retrieved 24 April, 2012, From <http://www.fao.org/ag/>.
- Fatima, T., D. Rivera, R. Troncoso, M. Tiznado y A. Handa (2008). Tomato. Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Vegetable Crops.
- Fernandez J. C., S. F. Yang (1992). Extraction and partial characterization of the ethylene-forming enzyme from Apple fruit. Plant Physiology 99: 751-754.
- Fimognari C., E. Turrini., L. Ferruzzi, M. Lenzi y P. Hrelia (2012). Natural isothiocyanates: Genotoxic potential versus chemoprevention. Mutation Research, 750: 107-131.
- Ford N. A., Jr J. W. Erdman (2012). Are lycopene metabolites metabolically active? Acta Biochimica Polonica 59: 1-4.
- Frenkel Ch., J. J. Jen (1989). Quality and preservation of vegetables. Tomatoes. C.R.C. Press, Inc. Boca Raton, Florida. Pp. 53-73.

Galan M. V., A. A. Kishan, A. L. Silverman (2004). Oral broccoli sprouts for the treatment of *Helicobacter pylori* infection: A preliminary report. *Digestive Diseases and Sciences*, 49(7-8): 1088-1090.

Giovannoni J. J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16: S170-S180.

Giuliano G., G. E. Bartley, P. A. Scolnik (1993). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell*, v.5, p.379-387.

Grierson D., G. A. Tucker (1983). Timing of ethylene and polygalacturonase synthesis in relation to control of tomato fruit ripening. *Planta* 157: 174-179.

Gupta S., X. Shi, I. E. Lindquist, N. Devitt, J. Mudge, A. M. Rashotte (2013). Transcriptome profiling of cytokinin and auxin regulation in tomato root. *Journal of Experimental Botany* 64(2):695-704.

Gutierrez, E. (2004). Caracterización de genes de poligalacturonasas de "*Fusarium oxysporum*" f.sp. "*Radiciis lycopersici*" y su análisis en sistemas heterólogos. Facultad de ciencias biológicas. Departamento de ciencias biológicas. Tesis doctoral 175 pp.

Hakim A., M. E. Austin, D. Batal, S. Gullo, M. Khatoon (2004). Quality of fresh-cut tomatoes. *Journal of Food Quality*. 27 (3): 195-206.

Hamilton, A. J., G. W. Lycett, D. Grierson (1990). Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346: 284-287

Hamilton, A. J. M. Bouzayen, D. Grierson (1991). Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7434-7437.

Hashem, F. A. y H. E. Wahba (2000). Isothiocyanates in myrosinase treated herb extract of *cleome chrysantha* decne and their antimicrobial activities. *Phytotherapy Research* 14(4): 284-287.

Hesse H., R. Hoefgen (2003). Molecular aspects of methionine biosynthesis. *Trends Plant Science*. 8: 259-262.

Hobson, G. E. y J. N. Davies (1971). The tomato. In: *The biochemistry of fruits and their products*. Ed. Academic press. London, England. (2): 619-626.

Hoffman, N. E. y S. F. Yang (1980). Changes of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in ripening fruits in relation to their ethylene production rates. *Journal American Society Horticulturae Science* 105(4): 492-495.

- Hong J. H., A. K. Cowan, S. K. Lee (2004). Glucose inhibits ACC oxidase activity and ethylene biosynthesis in ripening tomato fruit. *Plant Growth Regulation*, 43: 81-87.
- Huber, D. J., J. Jeong, J. Lee (2007). Softening and Ripening of 'Athena' cantaloupe (*Cucumis melo L. var. reticulatus*) fruit at three harvest maturities in response to the ethylene antagonist 1-methylcyclopropene. *Horticulturae science* 42: 1231-1236.
- Jeon J., D. J. Huber, S. A. Sargent (2002). Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell-wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea americana*) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 25(3): 241-256.
- Jiang, T. M., P. Wang, X. Yin, B. Zhang, C. Xu, L. Xian y K. Chen (2011). Ethylene biosynthesis and expression of related genes in loquat fruit at different developmental and ripening stages. *Scientia Horticulturae* 130(2): 452-458.
- Jiao, X. Z., S. Hadas, L. Y. Su y S. F. Yang (1986). The conversión of 1-(Malonylamino) cyclopropane-1-carboxylic acid to 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid in plant tissues. *Plant Physiol* 81(2): 637-641.
- Johnson, P. R., J. R. Ecker (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annual Review. Genetic.* 32, 227–254.
- Kader A. A. (2002). *Postharvest technology of horticultural crops*. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. Special Publication. 3rd ed. USA. Oakland, 3311. 3-7 pp.
- Kassie, F., S. Knasmuller (2000). Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Chemico Biological Interactions.* 127, 163–180.
- Katz, Y. S., G. Galili y R. Amir (2006). Regulatory role of cystathionine- γ -synthase and de novo synthesis of methionine in ethylene production during tomato fruit ripening. *Plant molecular biology* 61(1-2): 255-268.
- Kawakishi S., T. Kaneko (1987). Interaction of proteins with allyl isothiocyanate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35: 85-88.
- Ke D. S., A. G. Wang, G. Ch. Sun, L. F. Dong (2002). The effect of active oxygen on the activity of ACC synthase induced by exogenous IAA. *Acta Botanica Sinica*, 44(5): 551-556.

- Keller, N., M. N. I. Ducamp, D. Robert y V. R. Keller (2013). Ethylene removal and fresh product storage: A challenge at the frontiers of chemistry. Toward an approach by photocatalytic oxidation. *Chemical reviews*. 113 (7), 5029-5070 pp.
- Kende, H. (1993). Ethylene biosynthesis. *Annual review of plant biology* 44(1): 283-307.
- Kermanshai R, B. E. McCarry, J. Rosenfeld, P. S. Summers, E. A. Weretilnyk, G. J. Sorger (2001). Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. *Phytochemistry*. 57:427-35.
- Keuma Y. S., W. S. Jeong, A. N. Kong (2004). Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutation Research*, 555: 191-202.
- Khokon, A. R., M. S. Jahan, T. Rahman, M. A. Hossain, D. Muroyama, I. Minami, S. Munemasa, I. C. Mori, Y. Nakamura y Y. Murata (2011). Allyl isothiocyanate (AITC) induces stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 34(11): 1900-1906.
- Krongyut W., V. Srilaong, A. Uthairatanakij, C. Wongs-Aree, E. B. Esguerra, S. Kanlayanarat (2011). Physiological changes and cell wall degradation in papaya fruits cv. 'Kaek Dum' and 'Red Maradol' treated with 1-metnylcyclopropene. *International Food Research Journal* 18(4): 1251-1259.
- Lau, O. L. y S. F. Yang (1976). Inhibition of ethylene production by cobaltous ion. *Plant Physiology* 58(1): 114-117.
- Lelievre J. M., L. Tichit, P. Dao, L. Fillion, Y. W. Nam, J. C. Ppech, A. Latche (1997). Effects of chilling on the expression of ethylene biosynthesis genes in Passe-Crassane pear (*Pyrus communis L.*) fruits. *Plant Molecular Biology*, 33: 847-855.
- Lieberman, M. (1979). Biosynthesis and action of ethylene. *Annual Review of Plant Physiology* 30(1): 533-591.
- Liu L., J. Wei, M. Zhang, L. Zhang, Ch. Li, Q. Wang (2012). Ethylene independent induction of lycopene biosynthesis in tomato fruit by jasmonates. *Journal of Experimental Botany*, 63(16): 5751-5761.
- Lizada, M. C. C. y S. F. Yang (1979). A simple and sensitive assay for 1-amino cyclopropane-l-carboxylic acid. *Analytical Biochemistry*. 100: 140-145.

- Lois L. C., F. Rodriguez, N. Gallego, N. Campos, A. Boronat (2000). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant Journal*. 22: 503-513.
- López A. F. y P. A. Gómez (2004). Comparison of color indexes for tomato ripening. *Horticultura Brasileira*. 22 (3): 534-537.
- López G. R., J. L. Cabrera, L. J. Saucedo, L. Carreto, R. Villanueva, J. C. Díaz, M. A. Gómez, L. Herrera (2009). Ripening in papaya fruit is altered by ACC oxidase cosuppression. *Transgenic Research*. 18: 89-97.
- Masuda H., Y. Harada, T. Inoue, N. Kishimoto, T. Tano (1999). Wasabi, Japanese horseradish, and horseradish. Relationship between stability and antimicrobial properties of their isothiocyanates. In *Flavor and chemistry of ethnic foods, proceedings of the meeting held during the 5th chemical congress of North America, Cancun, November 11–15, 1997* (pp. 85–96).
- Mathooko, F. M. (1996). Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. *Postharvest Biology and Technology* 7(1): 1-26.
- McGuire R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *Horticulture Science* 27 (12).
- Mi L., A. J. Pasqua, F. L. Chung (2011). Proteins as binding targets of isothiocyanates in cancer prevention. *Carcinogenesis* 32(10): 1405-1413.
- Mithen, R. F., M. Dekker, R. Verkerk, S. Rabot, I. T. Johnson (2000). The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7): 967-984.
- Murthy, N. V. K. K., M. S. N. Rao (1986). Interaction of allyl isothiocyanate with mustard 12S protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34: 448-452.
- Nakamura, T., Y. Kawai, N. Kitamoto, T. Osawa y Y. Kato (2009). Covalent modification of lysine residues by allyl isothiocyanate in physiological conditions: plausible transformation of isothiocyanate from thiol to amine. *Chemical research in toxicology* 22(3): 536-542.
- Nakatsuka, A., S. Murachi, H. Okunishi, S. Shiomi, R. Nakano, Y. Kubo, A. Inaba (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*. 118, 1295–1305.

- Oetiker J.H., S. F. Yang (1995). The role of ethylene in fruit ripening. *Acta Hortic.* 398: 167-178.
- Patil, S. S. y C. S. Tang (1974). Inhibition of ethylene evolution in papaya pulp tissue by benzyl isothiocyanate. *Plant Physiology* 53(4): 585.
- Perera, M. B. (2000). El jitomate, la hortaliza de excelencia en exportación. *Claridades agropecuarias*.
- Pesis, E., D. Faiman y R. Goren (1995). Inhibition of ethylene production and ACC oxidase activity in avocado by acetaldehyde vapours. *Proceedings of the world avocado congress III. The Hebrew University of Jerusalem, Rechovoth, Israel.* 354-361 pp.
- Petersen, J., R. Belz, F. Walker y K. Hurle (2001). Weed suppression by release of isothiocyanates from turnip-rape mulch. *Agronomy Journal* 93(1): 37-43.
- Pinheiro, J., C. Alegria, M. Abreu, E. M. Goncalves y C. L. M. Silva (2012). Kinetics of changes in the physical quality parameters of fresh tomato fruits (*Solanum lycopersicum*, cv *Zinac*) during storage. *Journal of Food Engineering*.
- Plich, H. (1993). The effect of silver ions and other chemicals on ethylene production by apple fruit cylinders. *Fruit Science.* 10: 1-10.
- Plich, H. (2003). Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. En: Jankiewicz L. S. 1ra ed. Mundi-prensa. Skierniewice, Polonia.
- Pomeranz Y., E. C. Meloan (1978). *Food Analysis: Theory and Practice.* 1ra ed. Avi Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut. USA. Pp. 72.
- Rawel H. M., J. Kroll, B. Riese-Schneider, S. Haebel (1998). Physicochemical and enzymatic properties of benzyl isothiocyanate derivatized proteinases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 5043-5051.
- Rodríguez F. A., M. Rivera, G. A. González (2005). Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. Capítulo 21. Pp 447-474.
- Roje S (2006). S-adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry* 67: 1686-1698.
- Rosa, E. A. S., P. M. F. Rodrigues (1999). Towards a more sustainable agriculture system: The effect of glucosinolates on the control of soil-borne diseases. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 74(6): 667-674.

- SAGARPA (2010). Monografía de cultivos S. d. F. a. I. Agronegocios.
- SAGARPA (2012). Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Centro de Estadística Agropecuaria. Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Subsecretaría de Planeación. Dirección General de Estadística. <http://www.siea.sagarpa.gob.mx>
- SAGARPA (2013). Produce Mexico 39.5 toneladas de jitomates por cada hectárea. Retrieved 9/01/2014, 2014, from <http://www.siap.gob.mx/produce-39-toneladas-jitomate/>.
- Saladié M., A. J. Matas, T. Issacson, M. A. Jenks, M. Goodwin, K. J. Nikias, R. Xiaolin, J. M. Labavitch, A. Shackel, A. R. Femie, A. Lytovchenko, M. A. O'Neill, Ch. B. Watkins, J. K. C. Rose (2007). A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiology* 144: 1012-1028.
- Saltveit, M. E. (1999). Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 15(3): 279-292.
- Saltveit, M.E. (2005). Fruit ripening and fruit quality. In: Tomatoes. Ed. E. Heuvelink. CABI Publishing International. UK. 145-170 pp.
- Sargent, S. y C. Moretti (2002). Tomato. In: Gross, K. Wang, C. and Saltveit, M. (eds.). *The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks*. United States Department of Agriculture Handbook 66. <http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/contents.html>. February 2013
- Satoh, S. y Y. Esashi (1983). Alpha-aminoisobutyric acid, propyl gallate and cobalt ions and the mode of inhibition of ethylene production by cotyledonary segments of cocklebur seeds. *Physiol Plant* 57: 521-556.
- Schuch W., C. R. Bird, J. Ray (1989). Control and manipulation of gene expression during tomato fruit ripening. *Plant Molecular Biology*. 13: 303-311.
- Seymour G. B., N. H. Chapman, B. L. Chew, J. K. C. Rose (2013). Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits. *Plant Biotechnology*, 11: 269-278.
- Shin, I. S., H. Masuda, K. Naohide (2004). Bactericidal activity of wasabi (*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 255-261.
- Sisler E. C., S. M. Blankenship, M. Guest (1990). Competition of cyclooctenes and cyclooctadienes for ethylene binding and activity in plants. *Plant Growth Regulation*. (9): 157-164.

Sisler E. C., M. Serek (1997). Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. *Physiologia Plantarum*, 100: 577-582.

Snowdon, A. L. (1991). *A Color Atlas of Post-harvest Disease & Disorders of Fruits & Vegetables*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. (1) 30-57 pp.

Stoewsand, G. S. (1995). Bioactive organosulfur phytochemicals in Brassica oleracea vegetables. A review. *Food and Chemical Toxicology* 33(6): 537-543.

Story E. N., R. E. Kopec, S. J. Schwartz, G. K. Harris (2010). An update on the health effects of tomato lycopene. *Annual Review. Food Science Technology*, 1: 189-210.

Suttle, J. C. (1981). Effect of polyamines on ethylene production. *Phytochemistry* 20(7): 1477-1480.

Tieman D. M., A. K. Handa (1994). Reduction in pectin methylesterase activity modifies tissue integrity and cation levels in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruits. *Plant Physiology* 106: 429-436.

Tiznado, M. y R. Troncoso (2006). Control of fungal diseases with isothiocyanates. *Stewart Postharvest Review* 2(1): 1-14.

Tuomainen, J., C. Betz, J. Kangasjärvi, D. Ernst, Z. H. Yin, C. Langebartels y H. Sandermann (1997). Ozone induction of ethylene emission in tomato plants: regulation by differential accumulation of transcripts for the biosynthetic enzymes. *The Plant Journal* 12(5): 1151-1162.

Trevor V., Suslow y M. Cantwell (2013). *Tomate: (Jitomate): Recomendaciones para mantener la calidad postcosecha*. Postharvest Technology. Department of Plant Sciences, University of California, Davis.
http://postharvest.ucdavis.edu/Hortalizas/Tomate__Jitomate.

Troncoso, R., C. Espinoza, E. A. Sánchez, M. E. Tiznado y H. S. Garcia (2005). Analysis of the isothiocyanates present in cabbage leaves extract and their potential application to control *Alternaria* rot in bell peppers. *Food research international* 38(6): 701-708.

Troncoso, R., E. A. Sánchez, C. Ruelas, H. S. García y M. E. Tiznado (2005). Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85(9): 1427-1434.

Troncoso R. R., M. E. Tiznado (2013). Plant-Isothiocyanates as an alternative for sustainable disease control of horticultural crops. In: *Natural Products for*

Sustainable Crop Diseases Management. Editor: Kurucheve V., Sangeetha G., Jayaraman J. Sometido al CAB International.

Tsao, R., C. Peterson y J. Coats (2002). Glucosinolate breakdown products as insect fumigants and their effect on carbon dioxide emission of insects. *BMC ecology* 2(1): 5.

USDA (2012). Vegetable: Product Sheets. United States Department of Agriculture. <http://www.ers.usda.gov/topics/crops/vegetables-pulses/tomatoes>.

Van de Poel, B., I. Bulens, P. Lagrain, J. Pollet, M. L. Hertog, J. Lammertyn, M. P. De Proft, B. M. Nicolai y A. H. Geeraerd (2010). Determination of S-Adenosyl-methionine in Fruits by Capillary Electrophoresis. *Phytochemical Analysis* 21(6): 602-608.

Van de Poel, B., I. Bulens, A. Markoula, M. L. Hertog, R. Dreesen, M. Wirtz, S. Vandoninck, Y. Oppermann, J. Keulemans, R. Hell, E. Waelkens, M.P. De Proft, M. Sauter, B.M. Nicolai, A.H. Geeraerd (2012). Targeted systems biology profiling of tomato fruit reveals coordination of the Yang cycle and a distinct regulation of ethylene biosynthesis during postclimateric ripening. *Plant Physiology*, 160: 1498-1514.

Van de Poel, B., I. Bulens, Y. Oppermann, M. L. A. T. M. Hertog, B.M. Nicolai, M. Sauter, A. H. Geeraerd (2013). S-adenosyl-L-methionine usage during climacteric ripening of tomato in relation to ethylene and polyamine biosynthesis and transmethylation capacity. *Physiologia Plantarum* 148: 176-188.

Vázquez O. F., G. Caire, I. C. Higuera, G. Hernández (1997). High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in shrimp. *Journal Liquid Chromatographic*. 18 (10): 2059-2068.

Ververidis P. y P. John (1991). Complete recovery in vitro of ethylene-forming enzyme activity. *Phytochemistry* 30: 725–727.

Wang, S. Y., C. T. Chen y J. J. Yin (2010). Effect of allyl isothiocyanate on antioxidants and fruit decay of blueberries. *Food Chemistry* 120(1): 199-204.

Watada, A. E., R. C. Herner, A. A. Kader, R. J. Romani y G. L. Staby (1984). Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. *Horticulturae Science* 19.

Watkins C. B., J. F. Nock, B. D. Whitaker (2000). Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-methylcyclopropene (1-

MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 19: 17-23.

Wills R., B. McGlasson, D. Graham y D. Joyce (1998). *Postharvest: An introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals*. UNSW Press, Australia 1-262.

Wittstock, U. y B. A. Halkier (2002). Glucosinolate research in the Arabidopsis era. *Trends in Plant Science* 7(6): 263-270.

YANG S. F. (1985). Biosynthesis and action of ethylene. *Horticulturae Science* 20: 41-45

Yang, S. F. (1980). Regulation of ethylene biosynthesis. *Horticulturae Science* 15, 238–243.

Yang, S., S. S. Jiang, R. C. Van, Y. Y. Hsiao, R. L. Pan (2000). A lysine residue involved in the inhibition of vacuolar H⁺-pyrophosphatase by fluorescein 5'-isothiocyanate. *Biochimica et Biophysica Acta –Bioenergetics* 1460, 375-383

Yokotani, N., R. Nakano, S. Imanishi, M. Nagata, A. Inaba y Y. Kubo (2009). Ripening-associated ethylene biosynthesis in tomato fruit is autocatalytically and developmentally regulated. *Journal of experimental botany* 60(12): 3433-3442.

Yu, Y. B., D. O. Adams y S. F. Yang (1980). Inhibition of ethylene production by 2, 4-dinitrophenol and high temperature. *Plant Physiol.* 66: 286-290.

Zaariás L. (2003). Etileno. En: Azcón B. J. y M. Talón. (ed.) *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Interamericana McGraw-Hill, Madrid, España. 343-356. 581 pp.

Zasada, I. A. y H. Ferris (2003). Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. *Phytopathology* 93(6): 747-750.

Zhang, Z., J. S. Ren, I. J. Clifton y C. J. Schofield (2004). Crystal structure and mechanistic implications of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase-the ethylene-forming enzyme. *Chemistry & biology* 11(10): 1383-1394.

Zhao R., H. Xie, S. Lv, Y. Zheng, M. Yu, L. Shen, J. Sheng (2013). LeMAPK4 participated in cold-induced ethylene production in tomato fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93: 1003-1009.