

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL



PRODUCCIÓN Y CALIDAD NUTRICIONAL
EN FRUTOS DE TOMATE CHERRY CULTIVADOS EN DOS
INVERNADEROS MEDITERRÁNEOS EXPERIMENTALES:
RESPUESTAS METABÓLICAS Y FISIOLÓGICAS.

MIGUEL ÁNGEL ROSALES VILLEGAS
TESIS DOCTORAL
GRANADA, 2008



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



***Producción y Calidad Nutricional en Frutos de Tomate Cherry
Cultivados en dos Invernaderos Mediterráneos Experimentales:
Respuestas Metabólicas y Fisiológicas.***

Memoria de Tesis Doctoral presentada por el licenciado en Biología
Miguel Ángel Rosales Villegas para aspirar al grado de Doctor:

Fdo. Miguel Ángel Rosales Villegas

VºBº Los Directores del trabajo:

Fdo.: Dr. Luis M. Romero Monreal
Catedrático - Universidad de Granada

Fdo.: Dr. Juan Manuel Ruiz Sáez
Profesor Titular - Universidad de Granada

Granada, 2008

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Grupo de Investigación "Diagnóstico Nutricional de las Plantas Cultivadas en Condiciones Adversas" (AGR-161, Plan Andaluz de Investigación, Junta de Andalucía), del Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada (España). Además, este trabajo ha sido co-financiado por dicho grupo y por el proyecto I+D+I INIA-RTA-03-096061 (*"Evaluación ambiental y mejoras de la calidad de la producción y de eficiencia de uso de recursos del agrosistema invernaderos mediterráneos"*). Los resultados presentados en el Bloque III de esta Tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

- Journal of the Science of Food and Agriculture 86, 1545-1551 (2006).
- The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 82, 739-744 (2007).
- Scientia Horticulturae 113, 244-249 (2007).

Asimismo, parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos nacionales:

- XVI Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y IX Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Évora, Portugal (2005).
- X Jornadas del Grupo de Horticultura de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Granada, España (2006).
- XI Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Albacete, España (2007).
- XVII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Alcalá de Henares, Madrid, España (2007).

Después de estos cuatro años de trabajo, la verdad es que resulta difícil expresar en unas líneas todo el cariño y apoyo recibido, el cuál me han ayudado tanto a que llegue este momento. Por ello, me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que lo han hecho posible:

En primer lugar me gustaría agradecer la labor de mis directores de tesis, el Dr. Luis M. Romero Monreal y el Dr. Juan Manuel Ruiz Sáez, y a todo el laboratorio al que considero un grupo excepcional; es un placer trabajar con vosotros.

A Luis, por haberme brindado la posibilidad de introducirme en el apasionante mundo de la investigación y por su confianza. Muchas gracias por tus sabios consejos, por tu escucha incondicional y por tus ánimos en los momentos bajos.

A Juanma, mi ejemplo a seguir, por tantas cosas... para empezar por estar siempre a mi lado apoyándome, por darme la libertad necesaria para aprender, incluso equivocándome, y mostrarme el lado más optimista en cada situación. Gracias por confiar en mí, porque sin tu esfuerzo nunca habría llegado hasta aquí.

A Juanjo, mi compañero de batallas, porque empezamos juntos en esto y hemos sabido salir adelante en todas las dificultades. Y por lo más importante, tu amistad.

A Luismi, por estar siempre dispuesto a solucionar cualquier problema y por nuestras largas charlas sobre ciencia. Muchas gracias por ayudarme sobre todo en los últimos momentos de mi tesis, vas a llegar muy lejos.

A Mar, por tantos ratos divertidos que hemos pasado juntos y por estar siempre a mi lado, por escucharme y tenderme una mano amiga, te voy a echar mucho de menos.

A Bego, por mostrarme una sonrisa cada día y por ser una compañera excepcional. Gracias también por tu apoyo y cariño mostrado durante todo este tiempo.

A la gente que ha pasado por este grupo, especialmente a Ana y Rosa; y a mis compañeros más recientes, Eva, Rocío y Cristian, gracias por vuestra ayuda y apoyo, espero que sigáis manteniendo vivos los valores del concepto de “grupo”. Os deseo mucha suerte en vuestra carrera científica.

A los demás compañeros del Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de Granada, por su interés y ayuda en diferentes momentos de estos años. Muchas gracias a todos y cada uno de vosotros.

Al Dr. Nicolás Castilla, a la Dra. Teresa Soriano y a Olivia Hita, por vuestro esfuerzo en mantener a flote este proyecto tan interesante y por prestarme vuestra ayuda cada vez que la he necesitado.

A la Dra. Alejandra Covarrubias, del Dpto. de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de vivir esa experiencia inolvidable allí y de introducirme en el mundo de la biología molecular. Quisiera hacer este agradecimiento extensivo a todo su grupo por hacerme sentir uno más y por toda la ayuda que me prestaron durante esos tres meses, y especialmente a Betty, Rosi, Marina y Sonia por todo su apoyo.

A Merche, mi amiga incondicional, por estar siempre a mi lado cuidándome, por apoyarme tanto en lo bueno como en lo malo y por todo el cariño que me has dado durante todos estos años. Sé que llegarás lejos en tu carrera científica y siempre estaré ahí a tu lado para verlo.

No me quiero olvidar de otros muchos amigos, que a lo largo de todo este tiempo han estado ahí: Raúl, Efrén, Pedro, Bea, Alberto, Graci, Caro, Cris, Esme, Ramón y demás, gracias a cada uno de vosotros por los años compartidos y por los que nos quedan...

A mis hermanos, Javi y Jose, por ayudarme y enseñarme tanto, a mis cuñadas (Neli y Eli), y como no a mis sobrinas Laura y Neli, gracias a cada uno de vosotros por vuestra confianza y por estar ahí en todo.

A mis padres, por su paciencia, ánimo constante y fe ciega en mí, por enseñarme los valores más importantes de la vida y por haberme dado todo lo que he necesitado para llegar hasta aquí, estoy muy orgulloso de vosotros y este momento es también vuestro.

A mis abuelos, Felipe y Elena, por cuidarme y apoyarme en todo, y a Eduardo y María, que desde algún lugar sé que me seguís animando y dando fuerzas para seguir adelante. Y al resto de mi familia, tíos y primos, por sentir vuestro apoyo y cariño.

Y finalmente, a todos aquellos que en parte o de algún modo me han ayudado, gracias porque todos habéis aportado vuestro granito de arena para aprender algo de todos y cada uno de vosotros, lo cuál me ha servido para formarme día a día en la parte más difícil, a formarme como persona.

A mi familia y amigos

- ÍNDICE GENERAL -

BLOQUE I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
1.1. Generalidades botánicas del tomate.....	5
1.2. Antecedentes históricos del tomate.....	7
1.3. Características de los frutos de tomate.....	9
1.3.1. Características físicas.....	10
1.3.2. Índices de calidad.....	11
1.3.2.1. Sabor.....	12
1.3.2.2. Contenido nutricional.....	13
1.4. Manejo del cultivo de tomate: Producción.....	16
1.4.1. Importancia económica y producción mundial.....	16
1.4.2. Producción fuera de estación: El cultivo protegido.....	17
1.4.2.1. El invernadero plástico.....	18
1.4.2.2. Análisis económico del cultivo en invernadero.....	21
1.4.2.2.1. Aspectos generales.....	21
1.4.2.2.2. Estructuras de invernaderos y equipos.....	22
1.4.3. Ventajas y desventajas del invernadero en comparación al cultivo en campo abierto en relación a la calidad del producto.....	24
1.5. Manejo del cultivo del tomate: Calidad.....	26
1.5.1. Factores ambientales que afectan a la calidad del fruto de tomate....	26
1.5.1.1. Luz.....	27
1.5.1.2. Temperatura.....	30
1.5.1.3. CO ₂ y déficit de presión de vapor.....	31
1.5.1.4. Calidad del aire y contaminantes.....	32
1.5.2. Desórdenes fisiológicos comunes en el fruto de tomate.....	33
1.5.2.1. Mancha solar.....	33
1.5.2.2. Escaldado.....	34
1.5.2.3. Deformaciones “catface”.....	34
1.5.2.4. Podredumbre apical.....	34
1.5.2.5. Agrietado.....	35
1.5.2.6. Ahuecado.....	35
1.5.2.7. Punteaduras.....	36
1.5.2.8. Cicatrices en cremallera.....	36

1.5.2.9. Tejido blanco interno.....	36
2. OBJETIVOS.....	39
 <i>BLOQUE II. COMPARACIÓN DE LOS DOS INVERNADEROS MEDITERRÁNEOS</i>	
3. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES SOBRE LOS FRUTOS DE TOMATE CHERRY CULTIVADOS EN DOS INVERNADEROS MEDITERRÁNEOS: PRODUCCIÓN, DETOXIFICACIÓN DE H₂O₂ E INDICADORES DE ESTRÉS.....	47
3.1. Introducción.....	49
3.2. Material y métodos.	53
3.2.1. Descripción del área de ensayo.....	53
3.2.2. Descripción de los invernaderos experimentales.....	54
3.2.2.1. Sistema de baja-tecnología: Invernadero Parral Mejorado.....	54
3.2.2.2. Sistema de alta-tecnología: Invernadero Multitúnel.....	57
3.2.2.3. Otras características de los invernaderos.....	60
3.2.3. Material vegetal.....	61
3.2.4. Diseño experimental y condiciones de crecimiento del cultivo.....	62
3.2.5. Caracterización microclimática.....	67
3.2.6. Muestreo de los frutos.....	68
3.2.7. Análisis vegetal.....	69
3.2.7.1. Peroxidación de lípidos: MDA y LOX.....	69
3.2.7.2. Ácido ascórbico.....	69
3.2.7.3. H ₂ O ₂	71
3.2.7.4. Enzimas antioxidantes: SOD, CAT, APX.....	71
3.2.7.5. Prolina y azúcares.....	73
3.2.7.6. Análisis estadístico.....	74
3.3. Resultados y discusión.	75
3.3.1. Descripción de las condiciones ambientales en ambos invernaderos y sus efectos sobre la producción.....	75
3.3.2. Efectos de las condiciones ambientales sobre la peroxidación de lípidos.....	81
3.3.3. Condiciones ambientales en relación al contenido en ascorbato y enzimas de detoxificación del H ₂ O ₂	83
3.3.4. Efectos de las condiciones ambientales sobre los solutos osmoprotectores.....	88

3.3.5. Conclusión.....	92
4. CALIDAD NUTRICIONAL EN FRUTOS DE TOMATE CHERRY CULTIVADOS EN DOS INVERNADEROS MEDITERRÁNEOS EXPERIMENTALES.....	95
4.1. Introducción.....	97
4.2. Material y métodos.	104
4.2.1. Diseño experimental y condiciones de crecimiento.....	104
4.2.2. Análisis vegetal.....	104
4.2.2.1. Licopeno y β -caroteno.....	104
4.2.2.2. Fenoles totales y flavonoides.....	104
4.2.2.3. Antocianinas.....	106
4.2.2.4. Ascorbato total.....	106
4.2.2.5. FRAP y TEAC.....	106
4.2.2.6. DPPH y Poder Reductor.....	107
4.2.2.7. Azúcares, ácidos orgánicos, acidez valorable e índices del sabor.....	108
4.2.2.8. Análisis estadístico.....	109
4.3. Resultados y discusión.	110
4.3.1. Efecto de las condiciones ambientales sobre el contenido de algunos fitonutrientes y la capacidad antioxidante.....	110
4.3.2. Efecto de las condiciones ambientales sobre el contenido de azúcares y ácidos orgánicos.....	118
4.3.3. Conclusión.....	122
Interpretación del Bloque II.....	123
 <i>BLOQUE III. RESPUESTAS AL ESTRÉS EN EL EXOCARPO DE TOMATE</i>	
5. CONTENIDO EN ANTIOXIDANTES Y METABOLISMO DEL ASCORBATO EN EL EXOCARPO DE TOMATE CHERRY EN RELACIÓN A LA TEMPERATURA Y A LA RADIACIÓN SOLAR.....	133
5.1. Introducción.....	135
5.2. Material y métodos.	138
5.2.1. Diseño experimental y condiciones de crecimiento.....	138
5.2.2. Muestreo de los frutos y medida de los parámetros ambientales.....	138

5.2.3. Análisis vegetal.....	139
5.2.3.1. Pigmentos vegetales.....	139
5.2.3.2. Peroxidación de lípidos.....	139
5.2.3.3. Metabolismo del ascorbato: Ascorbato, H ₂ O ₂ , APX, DHAR, MDHAR, AO.....	139
5.2.3.4. Actividad antioxidante.....	141
5.2.3.5. Análisis estadístico.....	141
5.3. Resultados y discusión.	142
5.3.1. Descripción de la temperatura y la radiación solar y sus efectos sobre la producción.....	142
5.3.2. Efecto de la temperatura y la radiación solar sobre el contenido en antioxidantes y la peroxidación de lípidos.....	145
5.3.3. Efecto de la temperatura y la radiación solar sobre el metabolismo del ácido ascórbico.....	148
5.3.4. Conclusión.....	152
6. METABOLISMO DE LA PROLINA EN EL EXOCARPO DE TOMATE CHERRY EN RELACIÓN A LA TEMPERATURA Y A LA RADIACIÓN SOLAR.....	153
6.1. Introducción.....	155
6.2. Material y métodos.	158
6.2.1. Diseño experimental y condiciones de crecimiento.....	158
6.2.2. Análisis vegetal.....	158
6.2.2.1. Prolina.....	158
6.2.2.2. Metabolismo de la prolina: P5CS, OAT y PDH.....	158
6.2.2.3. Aminoácidos totales y proteínas solubles.....	159
6.2.2.4. Análisis estadístico.....	160
6.3. Resultados y discusión.	161
7. ACTIVIDADES SUCROLÍTICAS EN EL EXOCARPO DE TOMATE CHERRY EN RELACIÓN A LA TEMPERATURA Y A LA RADIACIÓN SOLAR.....	167
7.1. Introducción.....	169
7.2. Material y métodos.	171
7.2.1. Diseño experimental y condiciones de crecimiento.....	171
7.2.2. Análisis vegetal.....	171
7.2.2.1. Azúcares: Sacarosa, glucosa y fructosa.....	171

7.2.2.2. Almidón.....	171
7.2.2.3. Enzimas sucrolíticas: sacarosa sintasa e invertasas ácida y neutra.....	172
7.2.2.4. Análisis estadístico.....	173
7.3. Resultados y discusión.....	174
Interpretación del Bloque III.....	181
8. CONCLUSIONES.....	187
9. BIBLIOGRAFÍA.....	191

BLOQUE I

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. GENERALIDADES BOTÁNICAS DEL TOMATE.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L., anteriormente *Lycopersicon esculentum* Mill.) es una planta herbácea perenne, cultivada como anual, el cuál se cultiva para el consumo humano de sus frutos. Su taxonomía es la siguiente: Reino *Plantae*, División *Magnoliophyta*, Clase *Magnoliopsida*, Subclase *Asteridae*, Orden *Solanales*, Familia *Solanaceae*, Género *Solanum*, Especie *S. lycopersicum*. Las variedades precoces (las que florecen y fructifican más rápido) suelen alcanzar una longitud de 1.2 m; las tardías, en cambio, casi siempre presentan un mayor crecimiento llegando incluso a los 2.5 m de longitud. El hábito de crecimiento es muy diverso, siendo en su estadio juvenil erguidas y en su estadio adulto son semierguidas o decumbentes; esto es, el tallo no es lo suficientemente rígido como para soportar el peso de las hojas, ramas secundarias y frutos por lo que necesita de otra planta o alguna estructura para sostenerse. Por esta razón, es común ver diversas estructuras como tutores o espalderas en los cultivos de tomate con el fin de sostener a la planta. El tallo es anguloso, pubescente, con algunos pelos glandulares, mostrando al principio una consistencia herbácea y leñosa en estado adulto. La ramificación del tallo es simpodial, es decir, las yemas axilares desarrollan ejes sucesivos, mientras que las yemas terminales producen flores o abortan. Las ramitas que se originan en las yemas axilares dan hojas en todos los nudos y finalizan también en una inflorescencia. El sistema radicular es pivotante, muy denso y ramificado en los treinta primeros cm. Las hojas son alternas, bipinatisectas y pecioladas, con una longitud de 10 a 25 cm. El borde de los segmentos foliares es dentado (Smith, 1994).

En cuanto a las flores, éstas son hermafroditas, actinomorfas y péndulas, de 1 a 2 cm de largo y color amarillo brillante. En las especies silvestres de tomate la flor es pentámera, mientras que en los tomates cultivados el número de segmentos de cada ciclo es muy diverso, observándose muchas variaciones. El cáliz está formado por 5 a 10 segmentos, lineales a lanceolados y persistentes. Su tamaño va aumentando a medida que se va desarrollando el fruto. La corola es amarilla, rotada, con el tubo corto, dividida en 5 o más

lóbulos, con numerosos pelos glandulares en la cara dorsal, cinco o más estambres adheridos al tubo de la corola, de filamentos cortos y anteras conniventes, dehiscentes por hendiduras longitudinales. El pistilo es único, formado por la unión de 5 o 6 carpelos. El ovario es bilocular (existen hasta 10 lóculos en ciertas variedades cultivadas) con la placenta central carnosa. Los pedicelos presentan un pequeño estrangulamiento en la parte media que corresponde a la zona de abscisión. Las flores se disponen en cimas axilares paucifloras, cada una de las cuales lleva normalmente de 5 a 6 flores, pero a veces hasta 30 (Atherton y Rudich, 1986).

El fruto es una baya, siendo en ésta por lo general en las especies silvestres bilocular o 30-locular, presentando generalmente de 5 a 9 lóculos. En la epidermis de los frutos se desarrollan pelos y glándulas que desaparecen cuando éstos llegan a la madurez. En el ápice del fruto suelen observarse restos del estilo. La forma del fruto es variable, generalmente depresso-globoso u oblongo. Presentan numerosas semillas, pequeñas, aplanadas, amarillentogrisáceas, velludas, embebidas en una masa gelatinosa formada por el tejido parenquimático que llena las cavidades del fruto maduro. El tomate, al igual que sus congéneres silvestres, es una especie diploide con 24 cromosomas en sus células somáticas (Atherton y Rudich, 1986).



Imagen 1.1. Frutos de tomate maduros.

1.2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DEL TOMATE.

Durante muchos siglos, el tomate ha recorrido grandes distancias convirtiéndose en la fruta más popular en todo el continente americano. Es originario de los Andes del Perú, donde apareció silvestre con una fruta redonda de color rojo. Gradualmente se esparció a lo largo de Suramérica desde donde continuó su difusión hasta América Central. Allí, ya hace miles de años, lo llamaron *xitomatl* en el lenguaje Nahuatl (*xictli*, ombligo y *tomātl*, tomate, que significa “tomate de ombligo”), que era el idioma que hablaba la nación azteca, y que derivó actualmente al nombre de jitomate; fue allí donde fue cosechado, cultivado y mejorado, produciendo una mayor diversidad de frutos. Por muchos siglos, el tomate detuvo su camino en esa área (Smith, 1994).

Poco después de que Colón descubriera al Nuevo Mundo, el tomate continuó su expansión y ya para mediados del siglo XVI acompañó a los exploradores españoles en su retorno a Europa. En España se le adjudicó el nombre de “Pomo de Moro” o “Manzana Morisca;” siendo éste el primero de muchos nombres que se le asignaron. Su más antigua mención tuvo origen en Italia en 1544 en donde se le conoció como “Pomo d’oro” o “Manzana Dorada,” lo que sugiere que tal vez el primer tomate que llegó al antiguo continente fue el de una variedad de color amarillo.

Durante las décadas siguientes, el cultivo de las diferentes variedades de tomates se esparció por España, Italia y Francia donde fue llamado “Pomo d’amore” o “Manzana del Amor,” lo que vulgarmente podría haber sido una corrupción del nombre originalmente asignado en España. Éste fue aceptado muy pronto en la región del Mediterráneo como un comestible, pero durante su extensión hacia el norte y el este de Europa le tenían gran desconfianza y la mejor clasificación que obtuvo por más de un siglo fue la de una planta ornamental. Durante la época Elizabetiana, gran parte del pueblo inglés creía que su hermoso color rojo era una señal de alerta de que era una fruta venenosa. Este razonamiento abarcaba muchos factores: por su calidad de

miembro en la familia solanácea, por lo punzante de sus hojas y también simplemente por pura superstición, lo que hizo que se le asignara el nombre de “Melocotón de Lobo”, debido a que los alemanes relacionaban a las solanáceas con las brujas y con las personas que se convertían en lobos. En 1753, el naturalista Kart Linnaeus en honor a esta nota del folclor popular alemán, le asignó al tomate el nombre científico de *Solanum lycopersicum* por tratarse de un melocotón de lobo de la familia solanácea. En el año de 1768, los botánicos adoptaron para el tomate el nombre científico de *Lycopersicum esculentum* lo que se traduce literalmente como melocotón de lobo que se puede comer (Peralta y Spooner, 2007).

A pesar de haber sido confirmado científicamente que el tomate era comestible, todavía existía un gran temor a lo contrario. A pesar de que en las postrimerías de 1700 éste se cultivaba en algunas huertas caseras en Norteamérica – entre las que estaba incluida la de Thomas Jefferson – la gran mayoría de la gente tenía grandes reservas al respecto. Ya en 1812 el tomate era un ingrediente común en el aderezo de los “gumbos” criollos, así como de las “jambalayas” en la cocina sureña de la Unión Americana y en otras regiones de este país. Muchas personas, entre ellas el coronel Robert Johnson, trataban de persuadir a la gente de que el tomate no los mataría. Consecuentemente, en 1820 el coronel Johnson, en las gradas del tribunal de la ciudad de Salem del estado de Nueva Jersey, abiertamente trató de persuadir a un público muy dudoso de que el tomate no los mataría y frente a todos ingirió un tomate crudo. Es bien sabido que la multitud allí presente se impresionó cuando el coronel Johnson no cayó muerto al instante. Para el año de 1850 el tomate se encontraba ubicado en los mayores mercados urbanos de Norteamérica; tanto los campesinos como los hortelanos urbanos ya cultivaban el tomate. Sin embargo, en algunos libros de cocina aún se recomendaba que el tomate debía cocinarse por lo menos unas tres horas porque de esa forma “perdería su sabor de fruta cruda” (Atherton y Rudich, 1986).

Ya en el siglo XIX, tantos los científicos en Inglaterra, como en los Estados Unidos de América, creían que el tomate causaba cáncer. Finalmente, esta teoría fue descartada y como consecuencia las propiedades

anticancerosas del tomate recientemente han sido bien reconocidas. Estudios demuestran que los altos niveles de licopenos y antioxidantes encontrados en el tomate están muy correlacionados con el descenso en riesgo de cánceres del sistema digestivo, útero, próstata y páncreas en los seres humanos (Jones, 1999).

1.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS FRUTOS DE TOMATE.

El fruto de tomate es una baya formada por 2-12 lóculos que contienen las semillas. Tanto el tamaño con la forma del fruto se ven afectados por la polinización, la cuál determina el número de semillas que ocupan cada lóculo. Existe un rango substancial en las características del fruto entre las diversas variedades de tomate disponibles en la actualidad. Por ello, se han hecho una gran cantidad de mejoras a través de la reproducción mediante el desarrollo de híbridos que son resistentes a enfermedades (principalmente virus), y también se han mejorado tanto la producción como las características de calidad de los frutos (forma, color, acidez, etc.). El desarrollo más reciente ha consistido en la obtención de variedades cuyos frutos tienen un tiempo de conservación más largo (Thomas, 1995; 1996).

Muchas variedades de tomate son de color rojo debido al carotenoide que le da su color: el licopeno. Son muchos los genes conocidos que están implicados en producir tonos de color amarillo, naranja o verde en los frutos. Así, el fruto rosa se debe a un gen sencillo (Y) que inhibe la formación de los pigmentos amarillos en la epidermis del fruto.

En cuanto a su composición, cabe destacar que más del 90% del peso fresco del fruto de tomate es agua, y la disponibilidad de agua por la planta puede influir en el tamaño del fruto. A lo largo del desarrollo del fruto, se produce una disminución en el contenido en sacarosa, mientras que aumenta el contenido en almidón y azúcares reductores. El tomate es un alimento poco energético que aporta apenas 0.2 Kcal g^{-1} . Es una fuente interesante de fibra, minerales como el potasio y el fósforo, y de vitaminas, entre las que destacan

la C, E, provitamina A y vitaminas del grupo B, en especial B1 y B3. Además, presenta un alto contenido en carotenos como el licopeno, pigmento natural que aporta al tomate su color rojo característico. El alto contenido en vitaminas C y E, y la presencia de carotenos en el tomate convierten a éste en una importante fuente de antioxidantes, sustancias con función protectora de nuestro organismo.

1.3.1. Características físicas.

El fruto de tomate se clasifica botánicamente como una baya, la cuál presenta un tamaño que puede variar desde pequeño en los tomates tipo cherry, con sólo dos divisiones del ovario o lóculos (Imagen 1.2), al tomate multilocular tipo "corazón de buey" (Imagen 1.2). El número de lóculos definen



Imagen 1.2. Tomates tipo cherry (izquierda) y tipo "corazón de buey" (derecha), vistos desde arriba, desde abajo y en un corte transversal. Se pueden observar los 2 y 10 lóculos respectivamente, la placenta en cada uno de ellos y las semillas adheridas a tales placentas.

el tipo de fruto de la siguiente manera: 2 lóculos en los tipos cherry y pera (tomates procesados), de 4-6 lóculos en los cultivares comerciales para el mercado fresco, y más de 6 lóculos en el tipo grande “corazón de buey” para producción en jardín o invernadero (no muy eficiente, susceptible al agrietamiento y formas irregulares).

1.3.2. Índices de calidad.

La calidad debe definirse en función del uso al que va a ser destinado el producto por lo que en el caso del tomate fresco se debe tender al concepto de “calidad total” considerando todas las características valoradas por los consumidores, no sólo la forma, el color y la ausencia de daños, sino también el sabor, el aroma, la textura y el contenido nutricional (Jones, 1999).

- Apariencia física: color, tamaño, forma, defectos y deterioro. La calidad del tomate estándar se basa principalmente en la uniformidad de la forma (dependiendo del tipo puede ser redondo, forma globosa, globosa aplanada u ovalada) y el color (anaranjado-rojo a rojo intenso o amarillo claro, evitando las manchas), y en la ausencia de defectos de crecimiento y manejo. El tamaño no es un factor que defina el grado de calidad, pero puede influir de manera importante en las expectativas de su calidad comercial.
- Firmeza: Los atributos texturales más importantes en el tomate son carnosidad, jugosidad, harinosidad y sobre todo firmeza. El tomate debe ser firme al tacto, no debe estar suave ni deformarse fácilmente debido a sobremadurez. En este sentido, las demandas de los consumidores quedan relegadas, ya que con frecuencia los altos rendimientos están inversamente relacionados con aspectos de calidad como sabor y/o color.
- Sabor: Son numerosas las causas que determinan el variación del sabor del tomate, entre las que podemos mencionar: el contenido en azúcares, el grado de maduración, la nutrición vegetal, el genotipo y el manejo postcosecha. La intensidad del sabor del fruto está determinada

principalmente por el contenido en azúcares (fundamentalmente fructosa y glucosa), de ácidos orgánicos (cítrico, málico y acidez total) y la composición de compuestos volátiles. El gusto del consumidor determina que una mayor relación azúcares/acidez genera un efecto favorable en el sabor (Baldwin *et al.*, 1998).

- Características nutricionales: El contenido nutricional del tomate ha ganado interés ya que los consumidores están alcanzando una mayor conciencia sobre la salud, ya que existe una relación inversa entre el consumo de tomate y el riesgo en la aparición de ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y degeneración macular relacionada con la edad. Esto es debido a su elevado contenido en compuestos antioxidantes y minerales (Dorais *et al.*, 2008).

De entre los índices de calidad que acabamos de mencionar, cabe destacar principalmente el sabor y el contenido nutricional:

1.3.2.1. Sabor.

El fruto de tomate está formado mayoritariamente por agua, siendo entre 5-7% del contenido sólidos, de los cuáles cerca de la mitad son azúcares y un octavo son ácidos. El sabor del fruto es la mayor demanda del consumidor y que atrae mucho su atención. Peet (1996) describió el sabor del fruto basado en la acidez (bajo pH) y en el contenido en azúcares de la siguiente manera:

Acidez	Contenido en azúcar	Sabor
Alta	Alto	Bueno
Alta	Bajo	Agrio
Baja	Alto	Suave
Baja	Bajo	Insípido

Stevens *et al.* (1977) encontraron que la fructosa y el ácido cítrico eran más importantes en el dulzor y en la acidez que la glucosa y el ácido málico, siendo el pH una medida más objetiva de la acidez que la acidez valorable.

Estos autores también llegaron a identificar 11 compuestos volátiles y determinar que sólo 3 de ellos eran los más importantes en la determinación de las características organolépticas del tomate.

1.3.2.2. Contenido nutricional.

Recientemente, existe un gran interés público en atraer al consumidor hacia alimentos que pueden tener un efecto significativo sobre la salud humana, y que contienen unos niveles elevados de vitaminas, minerales y antioxidantes. Es ampliamente aceptado que una dieta saludable es un factor importante en la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer y enfermedades cardiovasculares y neuro-degenerativas. En la literatura científica, se han realizado muchos estudios que muestran una fuerte correlación inversa entre el consumo de tomate y el riesgo a padecer ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y degeneración macular asociada a la edad (Dorais *et al.*, 2008).

Davies y Hobson (1981) fueron los primeros en mostrar de forma general la composición de los frutos de tomate:

Constituyente	Materia seca (%)	Constituyente	Materia seca (%)
Azúcares		Minerales	
Glucosa	22	(K, Ca, Mg, P)	8
Fructosa	25	Otros	
Sacarosa	1	Lípidos	2
Sólidos insolubles en alcohol		Ácidos amino dicarboxílicos	2
Proteínas	8	Pigmentos	0.4
Sustancias pécticas	7	Ácido ascórbico	0.5
Hemicelulosas	4	Volátiles	0.1
Celulosas	6	Otros aminoácidos, vitaminas y polifenoles	1.0
Ácidos orgánicos			
Ácido cítrico	9		
Ácido málico	4		

El fruto de tomate ha atraído una atención considerable gracias a su elevado contenido en licopeno, el pigmento rojo antioxidante más conocido del fruto de tomate. Además, los tomates contienen cantidades importantes de vitamina A [una media de 1000 unidades internacionales (UI) por cada 100 g] y ácido ascórbico (vitamina C; entre 20-25 mg/100 g), y potasio (K; 200-210 mg/100 g). Muchas variedades de tomate varían su contenido en sólidos solubles entre 4.5-7%, siendo la gran parte de ellos fructosa y glucosa. El ácido cítrico es el ácido predominante en el zumo de tomate y el pH del fruto normalmente se encuentra por debajo de 4.5. La Tabla 1.1 muestra el contenido nutricional detallado de dos tipos de tomate.

Constituyente	Tomate (100 g porción comestible)	Tomate cherry (100 g porción comestible)
Agua, %	93.5	93.2
Energía, cal	22	22
Carbohidratos, g	4.75	4.9
Proteínas, g	1.05	1.00
Grasas, g	0.20	0.20
Fibras, g	0.55	0.40
Calcio (Ca), mg	12	29
Fósforo (P), mg	26	62
Potasio (K), mg	244	-
Sodio (Na), mg	3	-
Magnesio (Mg), mg	14	-
Hierro (Fe), mg	0.5	1.7
Vitamina A, UI	900	2000
Ácido ascórbico, mg	25	50
Vitamina B ₁ , mg	0.06	0.05
Vitamina B ₂ , mg	0.04	0.04
Niacina, mg	0.7	-

Tabla 1.1. Valor nutricional de dos tipos de tomates frescos (Anon, 1998).

Gracias a la realización de estudios epidemiológicos, ensayos clínicos y experimentales así como estudios *in vitro* en animales, se ha podido observar un efecto protector atribuido principalmente a la provitamina A (Mayne, 1996) y

otros carotenoides. Por consiguiente, los carotenoides son la mayor clase de compuestos que proveen de precursores a vitaminas esenciales y antioxidantes. De un total de 40 carotenoides encontrados en la dieta humana, sólo 25 se encuentran en la sangre debido a la absorción selectiva del tracto digestivo. De este número, de 9-20 derivan del tomate tanto fresco como procesado, siendo los más importantes: licopeno, α - y β -caroteno, luteína, zeaxantina y β -criptoxantina. El licopeno, que constituye cerca del 80-90% del total del contenido en carotenoides de los tomates maduros (Shi y Marguer, 2000) es el antioxidante más eficiente entre los carotenoides por su actividad detoxificadora del oxígeno singlete y de los radicales peroxilo (Sies y Stahl, 1998). Por otro lado, el β -caroteno, un potente precursor en la dieta de la vitamina A (Olson, 1989), constituye aproximadamente el 7% del contenido en carotenoides del tomate (Nguyen y Schwartz, 1999). El ácido ascórbico (vitamina C), además de ser el antioxidante más efectivo en las plantas (Smirnoff, 1996), es también un fotoquímico muy importante en el fruto de tomate. Excepto para algunos genotipos silvestres (*L. chilense*, *L. hirsutum*, *L. cheesemanii*, *Solanum lycopersicoides*) o nuevas variedades comerciales desarrolladas recientemente (Jones *et al.*, 2003), los frutos de tomate (*S. lycopersicum*) no suelen tener un contenido importante en antocianinas. El limitado aporte calórico, relativamente alto contenido en fibras, y la gran cantidad de minerales, vitaminas y fenoles como los flavonoides hacen del fruto de tomate un excelente “alimento funcional” que conlleva unos beneficios fisiológicos adicionales así como de requerimientos nutricionales básicos (Dorais *et al.*, 2008).

1.4. MANEJO DEL CULTIVO DE TOMATE: PRODUCCIÓN.

1.4.1. Importancia económica y producción mundial.

El tomate es la hortaliza más popular y difundida mundialmente, por lo tanto la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente en todo el mundo, y con ella su cultivo, producción y comercio. Con el incremento de la población mundial, también se ha incrementado el consumo de vegetales como parte de la dieta humana total. Su incremento anual en cuanto a producción en estos últimos años, se debe principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada. El tomate en fresco se consume principalmente en ensaladas, cocido o frito. En mucha menor escala se utiliza encurtido (Jones, 1999).

Tabla 1.2. Producción, área y rendimiento mundial del cultivo de tomate en 2006 según la FAO.

Localización	Producción (t x 10 ⁶)	Área (ha x 10 ³)	Rendimiento (t ha ⁻¹)
Mundo	125.54	4597.2	27.31
África	14.34	659.0	21.75
América	22.39	516.0	43.39
Asia	66.99	2794.8	23.97
Europa	21.33	618.3	34.49
Oceanía	0.50	9.1	55.21
Países más productores			
China	32.54	1405.1	23.16
Estados Unidos	11.25	170.0	66.18
Turquía	9.85	260.0	37.90
India	8.64	497.6	17.36
Egipto	7.60	195.0	38.97
Italia	6.35	122.2	51.98
Irán	4.78	138.8	34.45
España	3.68	57.3	64.21
Brasil	3.27	56.8	57.57
México	2.88	126.0	22.85

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el tomate es el segundo vegetal más cultivado en el mundo, después de la patata, alcanzándose en el año 2006 unos valores de producción de aproximadamente 125.5 millones de toneladas de tomate fresco en todo el mundo, en un área de cultivo de 4.6 millones de hectáreas. Como se muestra en la Tabla 1.2, entre los cinco países más productores del mundo encontramos a China, EEUU, Turquía, India y Egipto (FAOSTAT, 2006). De todo el mundo, Asia es el continente con mayor producción y área de cultivo de tomate, mostrando un rendimiento inferior a la media mundial, el cuál alcanza los valores más altos en Oceanía (Tabla 1.2).

1.4.2. Producción fuera de estación: El cultivo protegido.

El cultivo protegido es un sistema agrícola especializado en el cual se lleva a cabo un cierto control del medio edafoclimático alterando sus condiciones (suelo, temperatura, radiación solar, viento, humedad y composición atmosférica). Mediante estas técnicas de protección se cultivan plantas modificando su entorno natural para prolongar el periodo de recolección, alterar los ciclos convencionales, aumentar los rendimientos y mejorar su calidad, estabilizar las producciones y disponer de productos cuando la producción al aire libre se encuentra limitada. El factor determinante más relevante de la actividad productiva hortícola es el clima, destacando como principales limitaciones la falta o exceso de radiación solar o humedad, las temperaturas extremas, la deficiencia de nutrientes, la presencia de malas hierbas, el exceso de viento y el inadecuado contenido en CO₂ del aire (Castilla, 2004). La falta de agua es la limitación más importante para la producción agrícola. Las pérdidas provocadas por la sequía son similares a las inducidas por todos los demás factores climáticos juntos, incluyendo los excesos de agua, inundaciones, frío, granizo y viento (Boyer, 1982). El riego es, sin duda, el medio más antiguo para proteger a los cultivos de la sequía y ha permitido el desarrollo de la actividad agrícola en regiones áridas y desérticas que, sin riego, no serían tan productivas. En el último siglo, el cultivo protegido ha alcanzado una enorme importancia, ya que abarca diversas técnicas de protección de plantas que van mucho más allá del simple riego.

Este tipo de cultivo permite reducir las necesidades de agua, proteger los cultivos de las bajas temperaturas, reducir la velocidad del viento, limitar el impacto de climas áridos y desérticos, y reducir daños de plagas, enfermedades, nematodos, malas hierbas, pájaros u otros predadores. Además, también permite extender las áreas de producción y los ciclos de cultivo, aumentar y optimizar tanto la producción como la calidad, y estabilizar el suministro de productos de alta calidad a los mercados hortícolas (Wittwer y Castilla, 1995).

Todas las especies vegetales tienen un rango óptimo para cada parámetro ambiental. La colocación de una pantalla o protección junto a la planta altera las condiciones ambientales que afectan a toda la planta o a una parte de ella. La posición de la pantalla o protección respecto a la planta determina el tipo de protección (CPA, 1992). Cuando la pantalla se coloca sobre el suelo y debajo de los órganos aéreos de la planta, tenemos el acolchado. Cuando las pantallas se colocan sobre las plantas, a modo de cubierta, tenemos protecciones del tipo de invernaderos, túneles y cubiertas flotantes. Los invernaderos difieren de las demás protecciones en que son de mayor solidez y suficientemente altos y anchos para permitir el cultivo de especies de altura diversa, incluso árboles frutales. El área mediterránea (que incluye todos los países ribereños y Portugal) en 1987 lideraba la superficie mundial de invernaderos con 65.000 ha y alcanzó las 144.000 ha en el año 2000. Los invernaderos de plástico llegan a suponer en países como España el 99% de la superficie total, estimada en 47.700 ha en el año 2000, que duplica la superficie existente diez años antes (Castilla, 2004).

1.4.2.1. El invernadero plástico.

El desarrollo de los materiales plásticos ha sido una de las causas determinantes de la gran expansión de los invernaderos de plástico en todo el mundo. La reducción de costes, en relación con los invernaderos tradicionales de vidrio permitió su empleo en muchas áreas de clima suave o en épocas de clima benigno en regiones más frías, en condiciones ventajosas de rentabilidad, en la segunda mitad del siglo XX. El escaso peso de los

materiales plásticos en relación con el vidrio permitió reducir notablemente las estructuras de soporte del material de cerramiento y, en consecuencia, su coste (Castilla, 2004).

Un invernadero es una construcción que permite la delimitación de un compartimento de cultivo, en el cuál el clima difiere del existente al aire libre, por las modificaciones que provoca el material de cerramiento en los intercambios entre el suelo, el sustrato y la masa vegetal con el entorno (Villete, 1983). La nueva norma UNE-EN-13031-1 (Invernaderos: Proyecto y construcción) define al invernadero como una estructura usada para el cultivo y/o protección de plantas y cosechas, la cuál optimiza la transmisión de radiación solar bajo condiciones controladas para mejorar el entorno de cultivo y cuyas dimensiones posibilitan el trabajo de las personas en su interior (Castilla, 2004).

En los invernaderos, la función antes considerada principal de aumentar las temperaturas respecto al aire libre, a consecuencia del efecto “invernadero”, en algunos casos deja de serlo, quedando el interés del efecto invernadero limitado a periodos breves de bajas temperaturas, como ocurre en algunos invernaderos mediterráneos. En efecto, en algunas regiones resulta más importante el “efecto sombreo”, en época de alta radiación, o el “efecto cortavientos”, al menos en ciertas épocas del año. El cerramiento de los invernaderos con malla en vez de con lámina plástica, de reciente introducción en latitudes bajas, limita la radiación y vientos exteriores sin aumentar las temperaturas. En áreas muy áridas o desérticas, el aislamiento que aporta al invernadero respecto del medio exterior (muy seco y cálido) supone una concepción del cultivo protegido distinta de la convencional, al proporcionar una mejora de la humedad ambiental y limitar el aumento de la temperatura si el cultivo está bien regado. Ello ha inducido a hablar de un “efecto oasis” (Sirjacobs, 1988).

En un invernadero, la reducción de radiación respecto al exterior implica una reducción de las necesidades de riego (al disminuir la evapotranspiración), lo que unido a un aumento de las producciones permite hacer uso más

eficiente del agua de riego (Stanghellini, 1992). Ello es relevante en regiones de escasos recursos hídricos. En cambio, en regiones tropicales y subtropicales, de alta pluviometría, predomina en los invernaderos el efecto paraguas, pues el fin primordial de su empleo es evitar los efectos perjudiciales de las intensas y frecuentes lluvias sobre los cultivos, siendo indeseable normalmente el efecto invernadero, pues las condiciones térmicas naturales son suficientes, o incluso excesivas, para el desarrollo de los cultivos (Garnaud, 1987).

En tiempos pasados, los invernaderos se situaban junto a las ciudades, destinatarias de su producción. Las dificultades de transporte, hasta casi mediados del siglo XX, limitaban la expansión de los invernaderos a las proximidades de los centros de consumo. Hoy día, la ubicación de las áreas de producción está influida principalmente por las condiciones climáticas y por el tipo de especies a cultivar, que determinan los costes y calidad de la producción, así como por los costes del transporte hasta los mercados consumidores. También influyen otros factores técnicos (disponibilidad y calidad de agua de riego, características del suelo, etc.) y socioeconómicos (canales comerciales, nivel tecnológico de la zona, posibilidades financieras, infraestructuras de comunicación y de energía eléctrica, tamaño de explotación, disponibilidad de suministros para la producción hortícola, etc.) en una época marcada por la internacionalización de los intercambiadores comerciales y, en general, la globalización de la economía. Los desplazamientos de áreas de producción en invernadero habidos en las últimas décadas del siglo XX son una buena muestra de ello. En Europa, la producción de hortalizas en invernadero se ha desplazado desde el norte al área mediterránea, cuyas mejores condiciones climáticas en otoño e invierno permiten la producción a costes notablemente menores, al no emplear calefacción (Tognoni et al., 1988; 1989). Similares movimientos se dieron en EEUU al desplazarse, en parte, el cultivo en invernadero a California y Florida (de mejores condiciones climáticas) desde las zonas tradicionales de producción (Costa Este) y desde Colorado, donde se había creado un sector importante por sus buenas condiciones de iluminación que incidían en una mejor calidad del producto (Nelson, 1985; Wittwer y Castilla, 1995). El desplazamiento de áreas de producción a regiones

de clima más benigno posibilita el empleo de invernaderos menos sofisticados y, por tanto, de construcción más económica que permiten producir a costes más competitivos (Castilla *et al.*, 2004).

En invernadero, las plantas de tomate pueden mantenerse durante periodos de 6 a 9 meses de duración, o incluso más, conduciendo a las plantas hacia arriba mediante el uso de cáñamo o cordeles verticales, eliminando las hojas viejas a medida que se cosechan los racimos de frutos inferiores, y bajando el tallo principal para mantener la planta entera al alcance de los trabajadores. Este proceso puede ser mantenido siempre y cuando la planta esté en crecimiento activo, libre de enfermedades y otros estreses. En el invernadero, es posible controlar el ambiente y aquellos factores que afectan al bienestar de la planta y, en consecuencia, mantener la planta de tomate productiva durante un largo periodo de tiempo (Castilla, 2004).

1.4.2.2. Análisis económico del cultivo en invernadero.

1.4.2.2.1. Aspectos generales.

Tres factores básicos son determinantes para la elección de las áreas de producción en invernadero: el coste de producción, su calidad y el coste del transporte (Nelson, 1985), para poder competir en los cada vez más globalizados mercados de destino. Obviamente, el coste y la calidad de la producción dependerán de las condiciones climáticas locales, que determinarán tanto el nivel tecnológico de la inversión (exigencia de uso de invernaderos y equipos de climatación más o menos sofisticados) como su manejo. Las posibilidades del transporte a larga distancia han evolucionado enormemente en las últimas décadas, permitiendo que las áreas productoras, hoy día, se ubiquen lejos de los grandes centros de consumo, situación inviable hace medio siglo, lo que ha permitido el gran desarrollo de los invernaderos en las áreas litorales más favorecidas climáticamente (Italia, Francia, España, Marruecos, etc.) de los países de la cuenca mediterránea. Aunque en los costes finales del producto puesto en el mercado intervienen otros costes de

comercialización (tipificación, envasado, etc.), éstos suelen ser menos dispares que los de producción y transporte para productos de una determinada calidad que, procedentes de distintos orígenes, compiten en un mercado concreto (Castilla *et al.*, 2004).

El cultivo bajo invernadero cabe distinguir en Europa dos agrosistemas de producción: el “agrosistema nórdico u holandés”, típico del norte de Europa, que exige una gran inversión inicial (en estructura de invernaderos y equipos) y está caracterizado por un gran consumo de energía, y el “agrosistema mediterráneo”, caracterizado por un nivel de inversión bajo y un menor consumo de energía, que es típico de los países ribereños del Mediterráneo. Entre ambos agrosistemas, de niveles tecnológicos extremos, existen diversas graduaciones. En el “agrosistema holandés” la estrategia productiva ha sido optimizar el microclima en invernadero, mientras que en los invernaderos mediterráneos ha prevalecido la adaptación de los cultivos a microclimas subóptimos, lo que ha supuesto menor productividad y, en algunos casos, limitada calidad pero también menores costes de producción que el “agrosistema holandés” (Castilla, 2004).

1.4.2.2.2. Estructuras de invernaderos y equipos.

La elección de una determinada estructura de invernadero suele ir acompañada por la elección de un equipo de nivel tecnológico acorde con la estructura elegida, de modo que el “paquete tecnológico” (conjunto de estructura y equipo) permita conseguir unas prestaciones agronómicas idóneas a un coste adecuado.

En el agrosistema mediterráneo en España existen varios modelos tecnológicos de diferentes costes y prestaciones económicas. Básicamente, los modelos tecnológicos con perspectivas de futuro son dos, uno constituido por invernaderos de bajo coste tipo parral (que han sido mejorados como resultado de los proyectos de I+D: INIA 96061, CICYT AGF96-2512 y P.I.A. 9-01) de alta pendiente de cubierta, y otro constituido por invernaderos de mayor coste tipo multitúnel industrial que permiten niveles de equipamiento más completos. El

invernadero parral mejorado no se emplea en ciclos de verano, mientras que el multitúnel permite extender el cultivo a épocas de alta radiación, al estar dotado de equipos de climatización adecuados. Además, la coexistencia de ambos modelos tecnológicos de invernaderos, en sus diversas graduaciones de equipamiento, son actualmente una realidad (Castilla, 2004).

Tabla 1.3. Costes medios de construcción y equipamiento de invernaderos mediterráneos dotados de ventilación lateral y cenital motorizadas, en el sur de España (sin incluir impuestos) incluyendo el montaje de lámina plástica. Fuente: Castilla, 2004.

	euros m ⁻²
<i>Invernadero parral mejorado</i>	
Estructura	
<i>Baja pendiente de cubierta (tipo antiguo)</i>	(7.8)
<i>Alta pendiente de cubierta (27°/27°)</i>	10.2
Ventiladores (desestratificación)	1.2
Nebulización (baja presión)	1.8
Calefacción (aire caliente)	3.0
TOTAL	16.2
<i>Invernadero multitúnel curvo</i>	
Estructura	15.6
Ventiladores (desestratificación)	1.2
Nebulización (alta presión)	5.0
Calefacción (tubo metálico) e inyección CO ₂	11.3
Pantalla mixta (térmica y sombreo)	5.0
TOTAL	38.1

De las diversas opciones de equipamiento de estas estructuras, la Tabla 1.3 recoge algunas de las posibles, incorporando en el caso del invernadero parral mejorado un equipo de ventiladores de desestratificación y los sistemas más económicos de nebulización y de calefacción. En la estructura más costosa de multitúnel, se incorporan mejores equipos de nebulización y calefacción, así como pantalla térmica y de sombreo. Evidentemente, la elección concreta del equipo dependerá de cada caso y el ejemplo propuesto

(Tabla 1.3) sólo pretende ilustrar el importe de la inversión para un determinado “paquete tecnológico”. Así pues, el caso más simple de invernadero parral (tipo antiguo) sin equipos complementarios, que es el mayoritario hoy día en España, cuesta del orden de 7.8 euros m², mientras que el multitúnel bien equipado supondría del orden de 38.1 euros m², que es menos de la cantidad de un invernadero de vidrio completamente equipado (Castilla *et al.*, 2004). El coste de invernadero tipo parral mejorado de alta pendiente de cubierta es intermedio (Tabla 1.3). A estos valores habrá que añadir los gastos de inversión inicial media para la explotación del invernadero que suman un total de 9.8 euros m², que no incluyen el precio de la tierra. Finalmente, el nivel tecnológico del invernadero elegido determinará las posibilidades de gestión del clima y, por tanto, las prestaciones productivas y la rentabilidad del invernadero (Castilla, 2004).

En relación al estudio comparativo entre invernaderos, no existen estudios que comparen el efecto que tienen estos invernaderos sobre la producción y la calidad nutricional de los frutos de tomate en el clima mediterráneo. Por ello, durante estos últimos años se ha desarrollado el proyecto de investigación titulado “*Evaluación ambiental y mejoras de la calidad de la producción y de eficiencia de uso de recursos del agrosistema invernaderos mediterráneos*” (proyecto I+D INIA-RTA-03-096061).

1.4.3. Ventajas y desventajas del invernadero en comparación al cultivo en campo abierto en relación a la calidad del producto.

La competición entre los frutos cultivados en campo y en invernadero continúa a pesar de que la mayoría del fruto comercial fresco es y continuará siendo cultivado en el campo. Como ya se ha comentado anteriormente, la tecnología del invernadero ofrece muchos recursos para controlar las condiciones de luz (calidad y cantidad), temperatura, humedad, concentración de CO₂, y disponibilidad de agua y nutrientes. Así, la producción bajo cubierta presenta algunas ventajas en comparación con la producción al aire libre con respecto a una garantía de calidad (Bot, 2003). La gran ventaja es que los ambientes controlados ofrecen un camino para optimizar los parámetros

ambientales y el producto no es expuesto directamente a cambios bruscos de condiciones climáticas. Hay poco que los agricultores de cultivos de campo pueden hacer para incrementar la concentración de CO₂ en las inmediaciones de sus cultivos, pero el invernadero presenta una única oportunidad para modificar el ambiente aéreo (Hinklenton, 1988). Además de los factores ambientales, los factores de cultivo, así como el abastecimiento de agua, puede ser regulado bajo protección. Esto puede ser combinado con la adición de una cantidad precisa de fertilizante en el agua de irrigación. Además, mediante el uso de técnicas de cultivo sin suelo las plantas pueden crecer aisladas del suelo, lo que reduce la posibilidad de infecciones por patógenos edáficos (Gruda, 2005).

La calidad de los vegetales se ve fuertemente influenciada por la genética. La selección del cultivar es de principal importancia en conseguir la calidad del producto deseada. En general, existen algunas diferencias entre los cultivares usados para ambos tipos de cultivo. Por ejemplo, los tomates de invernadero son plantas indeterminadas, al contrario que en determinados campos y plantas de tomate (Dorais *et al.*, 2001). Por otro lado, bajo invernadero se pueden minimizar muchas enfermedades fisiológicas y otros problemas abióticos debido a un cambio correcto de cultivar con características de resistencia. A pesar de las ventajas en comparación con la producción al aire libre, los invernaderos nunca están completamente libres de la influencia de situaciones de estrés, especialmente con respecto al calor y la energía luminosa (Peet, 1999; Tognoni *et al.*, 1999). Además, los vegetales cultivados en invernadero suelen ser más sensibles a enfermedades que los cultivados en el campo (Gruda, 2005).

1.5. MANEJO DEL CULTIVO DEL TOMATE: CALIDAD.

1.5.1. Factores ambientales que afectan a la calidad del fruto de tomate.

La calidad del fruto de tomate se ve afectada significativamente por las condiciones ambientales a las que es sometido durante la maduración, por la fase de cosecha en la que es recogido de la planta, el número de veces que es manipulado, y por la temperatura y el tiempo de almacenaje. Cuanto más tiempo se mantiene el fruto en la planta más sabroso es, y por tanto tiene una mayor calidad nutricional. Una baja manipulación reduce la incidencia de marcas sobre el fruto, y se ha sugerido que el sabor se reduce conforme incrementa el manejo. Es frecuente observar cómo el tomate que no madura en la planta no tiene el mismo sabor y aroma que el tomate que desarrolla su madurez plena hasta un color rojo unido a la planta (Jones, 1999).

El fruto cosechado que es magullado en la recolección y posterior transporte liberará etileno (C_2H_4) que acelerará el proceso de maduración. En los estudios realizados por Sargent *et al.* (1997), encontraron que la madurez del fruto en la cosecha, las temperaturas de almacenaje (20°C) y las magulladuras internas afectaron negativamente tanto al sabor como a la calidad de los frutos de tomate.

Los dos factores ambientales mejor conocidos que influyen sobre la calidad nutricional de los frutos de tomate son la luz y la temperatura, los cuáles podrían estar estrechamente relacionados. Sin embargo, existen pocos estudios sobre el efecto directo de condiciones de elevada humedad del aire y de CO_2 sobre el contenido en fitonutrientes. Para los cultivos de tomate en campo, los cambios en los valores nutricionales a menudo se describen en términos de variación en la localización geográfica o la estación, las cuáles incluyen interacciones entre varios factores, haciendo difícil su interpretación. Por ejemplo, grandes altitudes reducen la temperatura pero incrementan la luz visible y UV, lo cuál puede inducir un aumento en la acumulación de ciertos fitonutrientes como los carotenoides, ya que su principal función es absorber la

luz durante la fotosíntesis y proteger a las células frente al exceso de luz (Dorais *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha descubierto que los carotenoides producidos en los frutos de cultivos de tomate protegidos son más elevados al final del periodo de cosecha que en la primera cosecha en Mayo (Auerswald *et al.*, 1996). Esto puede ser parcialmente debido a diferencias en la luz pero también al estatus de agua en la planta más pobre en las plantas viejas. Bajo condiciones de estrés hídrico, el aumento en ácido abscísico podría influir sobre la producción de etileno, que tiene un efecto sobre la concentración de carotenoides. Por tanto, el contenido en ácido abscísico en el fruto de tomate es más dependiente del cultivar que de los cambios estacionales (Shinohara *et al.*, 1982).

1.5.1.1. Luz.

Tanto la intensidad como la duración y la calidad de la luz afectan fuertemente a fitonutrientes del tomate como el ácido ascórbico, los carotenoides y los fenoles. Así, varios estudios han mostrado que antioxidantes como el ascorbato, licopeno, β -caroteno y fenoles incrementan ante una intensidad lumínica elevada (McCollum, 1954; Ju *et al.*, 1999; Lee y Kader, 2000; Merzlyak *et al.*, 2002; Amiot *et al.*, 2007). También se ha informado sobre una relación lineal entre la acumulación de antocianinas y la intensidad de luz (Ubi, 2004). Aunque la luz no es esencial en la síntesis de ascorbato, la cantidad y la intensidad de luz durante la estación de crecimiento influye en su contenido en el fruto, ya que el ascorbato se sintetiza a partir de azúcares suministrados a través de la fotosíntesis (Lee y Kader, 2000). De hecho, existe una correlación positiva entre el contenido en azúcares del fruto y el contenido en ascorbato y licopeno (Gautier, 2005). Similarmente, aunque la formación de carotenoides en el fruto de tomate maduro no requiere la inducción por luz, este factor ambiental juega un papel fundamental en la determinación del contenido en carotenoides. Por otro lado, la biosíntesis de antocianinas en el fruto maduro es un proceso dependiente de la luz (Lancaster, 1992), que requiere de una señal fotomorfogénica mediada por fotorreceptores. Así, varios autores han sugerido la participación en este proceso de fotorreceptores UV-B, fitocromos o criptocromos (Adamse *et al.*, 1989; Kerckhoffs *et al.*, 1992, 1997;

Mol *et al.*, 1996; Ninu *et al.*, 1999; Giliberto *et al.*, 2005). Por ello, para promover la producción fotosintética de carbohidratos se necesita una energía suficiente de luz, ya que los carbohidratos son sustratos en la biosíntesis de flavonoides a través de las rutas del ácido shikímico y fenilpropanoide. La formación de flavonol-glucósidos como kaempferol y quercetin también requieren luz, pero no toda la síntesis de fenoles es sensible a la luz.

La duración de la luz también afecta a los niveles de fitonutrientes. Aunque la luz no es necesaria para la maduración del tomate cuando es recogido en el estado pre-climatérico, la exposición del fruto a un fotoperiodo de 8-h no dio lugar a niveles de licopeno tan elevados como los de los frutos con 24-h en exposición (Cox *et al.*, 2003).

Últimamente, se ha comprobado que la calidad de la luz también es un factor determinante en la calidad nutricional del fruto. La luz roja estimula la acumulación de carotenoides en el tomate, mientras que la luz del rojo-lejano detiene la producción de carotenoides como el licopeno, probablemente desde los fitocromos localizados en el fruto (Thomas y Jen, 1975; Alba *et al.*, 2000). En contraste, el contenido en ascorbato incrementa con una exposición de luz infrarroja de 700-1100 nm (Gautier *et al.*, 2004). Esta respuesta podría ser debida a un efecto combinado de la calidad espectral y la temperatura del fruto, que afecta al metabolismo de los azúcares y consecuentemente al contenido en ascorbato (Gautier *et al.*, 2005). Un efecto positivo de la luz azul sobre los fitonutrientes del tomate es menos conclusivo debido a variaciones entre los genotipos y las condiciones de crecimiento (Jen, 1974; Spalding y Cosgrove, 1989, Parks *et al.*, 2001; Ménard *et al.*, 2006). Sin embargo, durante la maduración del fruto, aumentando la radiación fotosintéticamente activa (PAR) y más concretamente la luz azul, se produce un incremento en el contenido en licopeno y β -caroteno en el fruto (Gautier *et al.*, 2004). Para otras especies vegetales, la luz azul incrementa las concentraciones de ascorbato y antocianinas en el fruto (Spalding y Cosgrove, 1989; Parks *et al.*, 2001; Lester, 2006).

En contraste, bajo una radiación solar excesiva o UV-B de sólo unas pocas horas se podría producir un daño foto-oxidativo o fotoinhibición y reducir la síntesis de licopeno así como el contenido en ascorbato en el fruto de tomate (Adegoroye y Jolliffe, 1987; Prohens *et al.*, 2004). Por ejemplo, Torres *et al.* (2006) observaron que, tanto con o sin radiación UV, el fruto de tomate expuesto durante 5-h a una radiación solar elevada presentaba un 30% menos de ascorbato reducido (ASA) y un 20% menos de dehidroascorbato (DHA) en el exocarpo, sugiriendo una degradación parcial del “pool” total de ascorbato. Estos autores también observaron un descenso en los carotenoides totales después de 5-h de exposición a radiación UV. Para el ascorbato total (ASA+DHA), se observó una reducción similar con la radiación UV-B para los genotipos con bajo (Esperanza) y elevado (DRW 5981) licopeno, mientras que se encontró un aumento en el contenido en carotenoides y flavonoides en el genotipo (HP1) (Giuntini *et al.*, 2005). Un ambiente sin luz UV-B aumentó la actividad antioxidante y el contenido en carotenoides en Esperanza, mientras que se redujo el contenido en carotenoides de DRW 5981, y no hubo un efecto significativo sobre HP1.

Para los flavonoides, la síntesis de diferentes clases de estos compuestos fenólicos debería estar influenciada por las características del espectro (Awad y Jager, 2002), ya que la producción de estos compuestos y otros fenilpropanoides podría ser estimulada para proteger los tejidos vegetales del daño UV (Dixon y Palva, 1995; Ubi, 2004). Sin embargo, Torres *et al.* (2006) encontraron que el exocarpo de tomate no sufría cambios detectables en las concentraciones de flavonoides (quercetin, kaempferol o naringenin) conforme incrementaba la duración a la exposición. Por otro lado, los frutos de tomate crecidos bajo túneles y expuestos a una radiación solar UV ambiente (290-400 nm) tenían aproximadamente un 20% más de ácidos fenólicos (ácido cafeico, *p*-cumárico y ácido ferúlico) y un 10-16% más del contenido en fenoles totales que los frutos crecidos bajo condiciones de exclusión UV (Luthria *et al.*, 2006). Como UV-B ejerce efectos muy diferentes sobre el contenido en carotenoides (Giuntini *et al.*, 2005), las condiciones de luz deben ser consideradas en la selección de variedades o líneas.

1.5.1.2. Temperatura.

La temperatura tiene una influencia directa sobre el metabolismo vegetal y, por tanto, afecta tanto al desarrollo del fruto de tomate como a su valor nutricional (Heuvelink y Dorais, 2005; Dorais *et al.*, 2001). Puesto que se requiere una gran disponibilidad de esqueletos carbonados para la biosíntesis de ciertos fitonutrientes, como los flavonoides o el ascorbato, un incremento en la acumulación de azúcares a través de la reducción en la respiración bajo bajas temperaturas podría resultar en un mayor nivel de estos compuestos fitoquímicos. Consecuentemente, el ascorbato generalmente disminuye con el incremento en la temperatura, mientras que la regulación de los carotenoides por la temperatura es específica del cultivo.

La temperatura óptima del cultivo de tomate depende tanto del genotipo como de las interacciones con los factores ambientales y de cultivo (Dorais *et al.*, 2001), siendo mayor la síntesis de licopeno cuando la temperatura oscila entre 12 y 21°C (Dorais *et al.*, 2001). Así, Krumbein *et al.* (2006) observaron recientemente un incremento en la concentración en licopeno en los tomates tipo cherry y tipo redondo cuando la temperatura durante la fase de maduración del fruto incrementa de 15 a 20.3°C en otoño y de 18 a 22°C en primavera, encontrándose la temperatura óptima entre 20 y 24°C para la biosíntesis de licopeno. En concordancia a estos datos, Roberson *et al.* (1995) encontraron un estancamiento máximo en la concentración de licopeno entre 18 y 26°C en cultivos de suspensión celular. En general, temperaturas inferiores a 10 °C y superiores a 30°C inhiben el desarrollo de licopeno (Tomes, 1963; Koskitalo y Ormrod, 1972). Las temperaturas elevadas también presentan un efecto negativo sobre el β -caroteno y ascorbato, independientemente de su efecto sobre el metabolismo de los azúcares, pero dependiente de la competición de los asimilados. También, las temperaturas frías nocturnas en los cultivos de tomate en el campo reducen los carotenoides del fruto. En contraste al licopeno, el β -caroteno del tomate sólo se ve ligeramente afectado por la alta temperatura, probablemente debido a la conversión de licopeno en β -caroteno bajo condiciones de elevadas temperaturas.

En los cultivos de invernadero, los patrones de temperatura como las temperaturas día/noche o la integración de la temperatura a lo largo de varios días podría influir en los fitonutrientes de los frutos. Por ejemplo, Dorais (2007) encontraron que el uso de un pulso de baja temperatura (12°C comparado a 15°C, durante un periodo de 2-4 h) al final del fotoperiodo, donde se mantiene una temperatura media de 18.5°C durante 24-h, disminuyó el contenido en licopeno del fruto y su actividad antioxidante. Consecuentemente, el uso generalizado de una baja temperatura pre-nocturna en invernadero para un control del balance vegetal podría afectar las cualidades saludables de los frutos en la cosecha.

1.5.1.3. CO₂ y déficit de presión de vapor (DPV).

A pesar de que la concentración de CO₂ en la atmósfera ha incrementado drásticamente durante los últimos 150 años (270-367 $\mu\text{L L}^{-1}$; Watson *et al.*, 1990) debido a la combustión de carburante, la actividad volcánica, el desarrollo urbano y la intensificación de la producción industrial (Manning y Tiedemann, 1995; Romanova, 2005), se han realizado pocos estudios científicos sobre la influencia de la concentración de CO₂ del aire sobre el valor nutricional de los tomates. Sin embargo, sí que se conocen los efectos beneficiosos de las elevadas concentraciones de CO₂ sobre la producción de biomasa en cultivos hortícolas como el tomate (Nederhoff, 1994; Dorais *et al.*, 2001; Heuvelink y Dorais, 2005). De acuerdo con la hipótesis del balance fuente-sumidero, hay una tendencia general hacia un incremento en la concentración de compuestos secundarios de base carbónica en respuesta al aumento de CO₂ (Peñuelas y Estiarte, 1998). Sin embargo, este comportamiento ha sido mostrado sólo por algunas clases de compuestos secundarios de base carbónica como los fenoles, aunque su transporte hacia los frutos depende también de la especie y las condiciones de crecimiento. Por otro lado, una concentración elevada de CO₂ atmosférico parece reducir los estreses oxidativos en plantas (Idso e Idso, 2001), y consecuentemente se ha observado una reducción en las concentraciones de antioxidantes vegetales. En tomates, aunque el CO₂ estimula la producción de provitamina A, aparece un pequeño incremento (7%) en ascorbato en los frutos que han sido cultivados

con el triple de la concentración normal de CO₂ o en otros casos no se observa ningún efecto del enriquecimiento con CO₂ sobre el ascorbato (Özçelik y Akilli, 1999; Idso e Idso, 2001; Idso *et al.*, 2002). Además, no se ha encontrado ningún efecto del tratamiento con aire enriquecido con CO₂ sobre el contenido en carotenoides de tomates cherry y tipo redondo en invernadero, cultivados bajo diferentes grados de salinidad (Krumbein *et al.*, 2006).

La humedad del aire, generalmente expresada como DPV, influye enormemente en el estado hídrico vegetal y consecuentemente en la transpiración y en el transporte de los nutrientes. Dependiendo de la especie vegetal, un incremento en la humedad del aire entre 0.5-2.0 kPa o tiene poco efecto o incrementa la fotosíntesis (Heuvelink y Dorais, 2005). Sin embargo, es bien conocido que el DPV influye en la calidad externa de los frutos debido al desarrollo de desórdenes fisiológicos (Dorais *et al.*, 2001), aunque se conoce poco acerca de su efecto sobre los compuestos promotores de salud.

Algunos autores (Leonardi *et al.*, 2000; Dorais *et al.*, 2001) han encontrado que los frutos de tomate cultivados en invernadero tenían una coloración más intensa cuando las plantas crecían bajo un elevado DPV, lo que sugiere un mayor contenido en licopeno posiblemente debido a un estado hídrico vegetal sub-óptimo. Es posible que una reducción en la acumulación neta de agua en los frutos sometidos a un DPV elevado pudiera concentrar los fitoquímicos saludables del fruto (Guichard *et al.*, 1999).

1.5.1.4. Calidad del aire y contaminantes.

Uno de los procesos fisiológicos que pueden alterar o reducir la calidad nutricional y la actividad antioxidante de los productos vegetales es el estrés oxidativo (Torres *et al.*, 2006). Por ejemplo, los contaminantes aéreos (polvo, ozono, dióxido de azufre, óxido nítrico, nitrito y amonio) disminuyen el contenido en ascorbato, carotenoides y vitaminas del complejo-B en muchos frutos principalmente debido al daño oxidativo del ADN, proteínas, síntesis enzimática y membranas (Lester, 2006). El ozono puede alterar metabolitos secundarios como los flavonoides y otros compuestos fenólicos, a través de

cambios en la actividad fenilalanina amonioliasa (PAL) y así el estado y productividad de toda la ruta fenilpropanoide (Manning y Tiedemann, 1995). La distribución de carbono en las plantas podría afectarse también por el O₃ a través de efectos sobre la fotosíntesis y el ambiente alrededor del fruto, lo que podría afectar indirectamente a su valor nutricional. El efecto de los contaminantes del aire producidos por la volatilización de pesticidas bajo elevada temperatura sobre los compuestos saludables es otro aspecto que no se ha investigado extensivamente en el fruto de tomate.

Otra fuente potencial de contaminantes son los biosólidos procedentes de lodos de aguas residuales o de los residuos industriales, que son usados en algunos países como fertilizantes en cultivos hortícolas como los tomates. Existe poca información científica disponible sobre el efecto global de los contaminantes presentes en estos biosólidos (plomo, cadmio, mercurio, hormonas, antibióticos, compuestos orgánicos persistentes) sobre los fitonutrientes del tomate. Por ejemplo, sí se ha comprobado que los residuos de partículas presentes en los suelos pueden ser translocados al fruto (González *et al.*, 2005). A pesar del aumento en la preocupación de los consumidores por el contenido en residuos pesticidas en los frutos y vegetales, se conoce poco acerca de sus efectos directos sobre los fitonutrientes en plantas.

1.5.2. Desórdenes fisiológicos comunes en el fruto de tomate.

Las condiciones ambientales a las que se exponen los frutos de tomate durante su crecimiento son determinantes en su desarrollo y, por tanto, como hemos descrito en el apartado 1.3, en su calidad nutricional. Cuando se produce una situación de estrés abiótico, se pueden desencadenar una serie de desórdenes fisiológicos que alteran tanto la calidad del fruto como su aceptabilidad en el mercado. Así, las fisiopatías más comunes en los frutos de tomate son las siguientes (Jones, 1999):

1.5.2.1. Mancha solar: se caracteriza por la formación de un anillo amarillo-anaranjado que rodea la zona de abscisión del fruto, producido por una disminución en la síntesis de licopeno u oxidación de éste a β -caroteno, debido

a una alta radiación y/o una elevada temperatura (Adegoroye y Jolliffe, 1983). El control de esta fisiopatía se realiza mediante el uso de cultivares resistentes, técnicas de sombreo o refrigeración en los invernaderos, reducción de la exposición de los frutos al sol, o mediante la maduración con etileno de los tomates verdes en oscuridad (Imagen 1.3).

1.5.2.2. Escaldado: los frutos desarrollan un tejido necrótico de color blanco rodeado de un halo amarillo. La causa principal es la exposición repentina al sol de frutos cubiertos por hojas, y posterior ataque por hongos secundarios. La poda y recolección cuidadosas minimizan el problema, o también mediante un buen programa de control de enfermedades foliares (Imagen 1.3).



Imagen 1.3. Mancha solar (izquierda) y escaldado (derecha) en frutos de tomate.

1.5.2.3. Deformaciones “catface”: se generan tomates amorfos, con grandes cicatrices y agujeros en el extremo pistilar. Las causas son poco conocidas, aunque podría ser debido al frío, a la poda o a altos niveles de N. Se puede controlar mediante el uso de cultivares no susceptibles o con calefacción para evitar las bajas temperaturas en los invernaderos (Imagen 1.4).

1.5.2.4. Podredumbre apical: también conocida como “blossom-end rot” (BER), comienza con la aparición de lesiones de coloración tostado claro a oscuro en el extremo pistilar, que desencadenan una podredumbre negra secundaria. Pueden producirse también lesiones negras internas, induciendo una

maduración más rápida del fruto. Esta fisiopatía se debe a una deficiencia de Ca en el extremo distal del fruto, o a condiciones que reduzcan la absorción radicular de Ca (humedad relativa elevada o alta salinidad). El control se lleva a cabo mediante una aplicación adecuada de fertilizantes y de agua, uso de cultivares tolerantes, realizándose enmiendas con piedras ricas en Ca (calizas o dolomíticas) o mediante la aplicación foliar de cloruro cálcico anhidro (Imagen 1.4).



Imagen 1.4. Deformaciones “catface” (izquierda) y podredumbre apical (derecha) y en frutos de tomate.

1.5.2.5. Agrietado: grietas concéntricas o radiales a partir de la cicatriz peduncular del tomate. Está relacionado con la fuerza y la capacidad de estiramiento de la epidermis del fruto, siendo producido por un aumento en la humedad relativa y exposición al sol, o por la formación de plantas suculentas (con una nutrición alta de N y baja de K). Se puede controlar mediante el uso de cultivares tolerantes al agrietado, por un programa de irrigación y nutrición mineral adecuado o reduciendo la exposición de los frutos al ambiente (Imagen 1.5).

1.5.2.6. Ahuecado: los tomates externamente presentan zonas aplastadas, correspondientes al hinchazón de los lóculos. Se puede producir por una polinización, fertilización o desarrollo seminal incorrectos, luz insuficiente y temperaturas extremas, o por el uso de auxinas para mejorar el cuajado del

fruto. Se previene proporcionando un buen estado nutricional o mediante el uso de cultivares resistentes (Imagen 1.5).

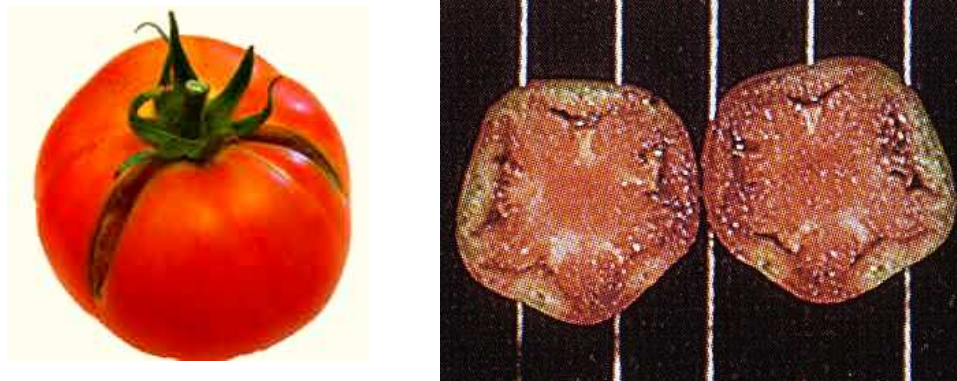


Imagen 1.5. Agrietado (izquierda) y ahuecado (derecha) en frutos de tomate.

1.5.2.7. Punteaduras: se producen cicatrices amarillas o marrones, necróticas, desde la cicatriz peduncular. La causa es desconocida, aunque es más frecuente en cultivares de frutos grandes. Se controla usando cultivares resistentes (Imagen 1.6).

1.5.2.8. Cicatrices en cremallera: se forman cicatrices estrechas, marrones y necróticas, desde el extremo peduncular hasta el pistilar, con pequeñas lesiones transversales a lo largo de ella. Se produce por la unión de las anteras a la pared del ovario del nuevo fruto, siendo más pronunciado en climas fríos. Como medida de control se usan cultivares tolerantes y, en invernadero, manteniendo temperaturas adecuadas (Imagen 1.6).

1.5.2.9. Tejido blanco interno: se generan fibras blancas dispersas o agrupadas, distribuidas por el mesocarpo y el tejido placentar. Se debe a un estado nutricional pobre en K o a altas temperaturas. Un aporte nutricional adecuado, evitar condiciones de estrés y utilizar cultivares resistentes puede controlar esta fisiopatía (Imagen 1.6).

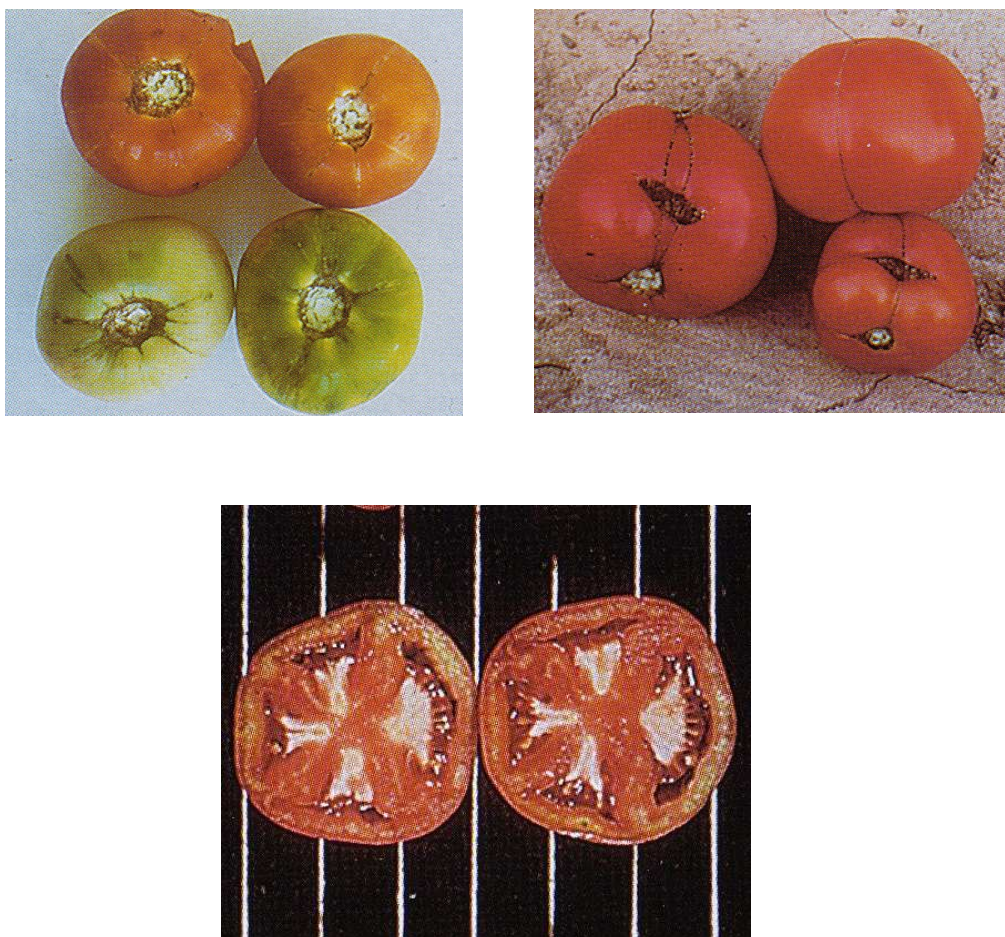


Imagen 1.6. Punteaduras (izquierda) y cicatrices en cremallera (derecha) y tejido blanco interno (abajo) en frutos de tomate.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

Los invernaderos mediterráneos permiten producir en condiciones subóptimas un gran número de productos hortícolas a un bajo coste, mediante el uso de invernaderos poco tecnificados con un mínimo control climático. Hoy día, la fuerte competitividad del mercado destaca la necesidad de aumentar la calidad de los productos hortícolas de invernadero mediante un mejor control climático, por lo que es necesario encontrar un compromiso económico entre los mayores costes de los invernaderos mejorados y sus prestaciones agronómicas. Así, en el agrosistema mediterráneo de España existen varios modelos tecnológicos, invernaderos con diferente nivel de equipamiento con distintos costes y prestaciones agronómicas, entre los cuáles pueden optar los agricultores según las estrategias de producción elegidas en cada caso. Los modelos tecnológicos con perspectivas de futuro son dos: invernaderos tipo parral mejorado, de bajo coste y nivel tecnológico, e invernaderos tipo multitúnel industrial, de mayor coste y que permite niveles de equipamiento más completos. El invernadero parral mejorado no se emplea en ciclos de verano, mientras que el invernadero multitúnel permite extender el calendario de cultivo a épocas de alta radiación, al estar dotado de equipos de climatización adecuados. Sin embargo, en ambos tipos de invernaderos el control de las condiciones climáticas es un problema debido a la gran intensidad de la luz solar, a las elevadas temperaturas y al alto DPV del aire durante el verano, los cuáles pueden influir tanto en la producción y como en la calidad nutricional de los frutos de tomate cherry, y desencadenar situaciones de estrés ambiental. Con el fin de evitar estas situaciones de estrés, en la actualidad se están introduciendo en la región mediterránea invernaderos de alta-tecnología, aunque su efecto sobre la fisiología del fruto es todavía desconocida en la mayoría de las plantas hortícolas (Castilla, 2004).

Nuestro grupo de investigación ha realizado numerosos trabajos experimentales sobre las plantas cultivadas en condiciones adversas. En el mundo científico, la mayoría de las investigaciones realizadas hasta el presente se han centrado en la utilización de diversos estreses abióticos: fluctuaciones en la intensidad luminosa, condiciones térmicas extremas, congelación, salinidad, sequía, exposición al SO₂ u O₃, etc., y el estudio de las respuestas

de resistencia principalmente en hojas. Sin embargo, existen pocos estudios específicos de cómo las variables ambientales influyen sobre los mecanismos de respuesta al estrés en los frutos de tomate.

Por tanto, y considerando la importancia económica y nutricional del cultivo de tomate y sus productos alimentarios, los objetivos fundamentales de este trabajo fueron los siguientes:

1. Comprobar cómo el control de los factores ambientales (temperatura, radiación solar y DPV) influyeron sobre la producción, la respuesta de varios indicadores de estrés ambiental y la calidad nutricional en frutos de tomate cherry cultivados en dos tipos de invernaderos mediterráneos experimentales: baja-tecnología (parral mejorado) y alta tecnología (multitúnel). Con este objetivo intentamos evaluar estos dos tipos de invernaderos mediterráneos experimentales tanto desde el punto de vista agronómico (estudio de la producción y calidad nutricional) como fisiológico (respuestas metabólicas y bioquímicas frente a la alteración de las variables ambientales).
2. Estudio de la respuesta fisiológica en la fracción exocárpica de los frutos de tomate cherry bajo condiciones de estrés ambiental. En este objetivo estudiaremos la respuesta de diversos procesos fisiológicos en plantas que intervienen en la tolerancia al estrés ambiental en la fracción más expuesta a las variaciones climáticas, como es el exocarpo, con el fin de definir los indicadores bioquímicos que sean útiles en la selección o desarrollo de frutos de tomate cherry resistentes a las alteraciones climáticas.

BLOQUE II

En el área mediterránea, las condiciones ambientales influyen directamente sobre los cultivos de invernadero, sobre todo debido a las condiciones desfavorables producidas por el incremento en las temperaturas, radiación solar y DPV durante el verano. Estas variables ambientales pueden conllevar a serias consecuencias en la calidad de los cultivos hortícolas, produciendo pérdidas tanto en la producción y como en la calidad nutricional. Por ello, en la actualidad se están introduciendo en la región mediterránea invernaderos de alta-tecnología que permitan un mayor control de las condiciones ambientales e intentar reducir considerablemente las consecuencias del estrés ambiental sobre los cultivos. Por tanto, en este bloque se aborda el primer objetivo de este trabajo con el estudio comparativo de dos tipos de invernaderos mediterráneos experimentales: parral mejorado (de bajo coste y nivel tecnológico) y multitúnel (de mayor coste y que permite niveles de equipamiento más completos). En ambos invernaderos estudiaremos cómo diferentes condiciones ambientales (temperatura, radiación solar y DPV) afectan a la producción y a la calidad nutricional de los frutos de tomate cherry. Además, en este bloque analizaremos en los frutos de tomate la respuesta de diferentes indicadores bioquímicos característicos de la presencia de un estrés ambiental en ambos invernaderos. En definitiva, lo que pretendemos en este bloque es definir las condiciones ambientales óptimas para la mejora de la producción y la calidad nutricional de los frutos de tomate cherry cultivados en invernadero.

CAPÍTULO 3

INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES
SOBRE LOS FRUTOS DE TOMATE CHERRY CULTIVADOS
EN DOS INVERNADEROS MEDITERRÁNEOS: PRODUCCIÓN,
DETOXIFICACIÓN DE H₂O₂ E INDICADORES DE ESTRÉS

3.1. INTRODUCCIÓN.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta hortícola anual con una importante distribución a lo largo del mundo y un gran valor económico, la cuál presente una serie de efectos beneficiosos a través de su consumo debido a su elevado contenido en compuestos antioxidantes (Bilton *et al.*, 2001). Según la FAO, el tomate es el segundo vegetal más cultivado en el mundo, después de la patata, con una producción mundial de aproximadamente 125×10^6 t de tomate fresco en 4.6×10^6 por todo el mundo, siendo China, EEUU y Turquía los principales productores (FAOSTAT, 2006). En varias regiones del área mediterránea, los tomates cherry se cultivan a lo largo del año en invernaderos de plástico, siendo España el país donde se encuentra la mayor superficie de invernaderos (Castilla, 2004).

El clima mediterráneo está caracterizado por un aumento en la radiación solar, en las temperaturas y en el DPV durante los meses de verano. Estas variables ambientales pueden limitar severamente tanto la productividad como la calidad nutricional de un cultivo (Adams *et al.*, 2001). Existen varios factores ambientales que pueden desencadenar una situación de estrés, entre los que se pueden incluir: contaminación aérea (ozono y dióxido de azufre), aplicación de herbicidas, presencia de metales pesados, sequía, salinidad, aparición de lesiones, luz UV, temperaturas extremas, y foto-inhibición producida por una radiación solar excesiva (Buchanan *et al.*, 2000; Apel y Hirt, 2004). De ellos, la temperatura, la radiación solar y el DPV son fundamentales en los agrosistemas de cultivo intensivos, como los invernaderos, donde se desarrolla la mayor parte del cultivo del tomate (Adams *et al.*, 2001; Lee y Chen, 2002). Por tanto, estas condiciones ambientales adversas pueden generar ROS en los frutos de tomate cherry cultivados en invernadero (Dumas *et al.*, 2003), las cuáles pueden atacar todo tipo de biomoléculas y causar el deterioro de las membranas, peroxidación de lípidos y mutaciones en el ADN, conduciendo a una serie de disfunciones metabólicas y estructurales, y finalmente a la muerte celular. Estos cambios oxidativos se han caracterizado colectivamente como síntomas de un síndrome denominado 'estrés oxidativo' (Halliwell y Gutteridge,

1989; Foyer y Noctor, 2005). El oxígeno molecular (O_2) posee la propiedad inusual de tener dos electrones desapareados con espín paralelos. Además, el oxígeno también es capaz de aceptar algún electrón, lo que daría lugar a la formación de los ROS. Estos radicales libres son moléculas con un electrón desapareado y muchos de ellos son altamente reactivos. En la cadena de interconversión redox desde O_2 a H_2O (lo que requiere un total de 4 electrones por molécula de O_2) están implicados muchos intermediarios ROS. Todos ellos son menos estables que el O_2 o el H_2O . Las ROS incluyen al radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el oxígeno singlete (1O_2 ; Elstner y Oswald, 1994; Foyer y Noctor, 2005). Como resultado se produce una gran peroxidación de lípidos, que puede ser cuantificada mediante la medida del contenido en malondialdehído (MDA) y la actividad lipooxigenasa (LOX; EC 1.13.11.12), la cuál puede desencadenar la muerte celular y posterior necrosis de los tejidos del fruto (Fu y Huang, 2001; Mittler, 2002).

Para controlar los niveles de ROS y proteger a las células bajo condiciones de estrés, los tejidos vegetales contienen enzimas que detoxifican esos ROS, como la superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1), la catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) o la ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11), así como un amplio grupo de antioxidantes no-enzimáticos (Blokhina *et al.*, 2003). Este sistema realiza una serie de funciones determinadas, tales como la protección tras un exceso de absorción de energía luminosa, una vía alternativa de regeneración del NADP, la detoxificación de los distintos ROS, la reparación de las estructuras dañadas por la oxidación y la regulación de todos los procesos celulares (Salin, 1988; Foyer *et al.*, 1994; Smirnoff, 2000).

La detoxificación del $O_2^{\bullet-}$ se consigue a través de una enzima, la SOD, encargada de catalizar la dismutación de superóxido a H_2O_2 . El nivel intracelular de H_2O_2 está regulado por un amplio rango de enzimas, siendo las catalasas y las peroxidases las más importantes. Las CATs son unas enzimas localizadas en el peroxisoma que, al contrario que las peroxidases, no requieren un sustrato reductor para realizar su actividad. Sin embargo, las APXs son las principales encargadas de detoxificar el H_2O_2 , operando tanto en

el citosol como en los cloroplastos, usando el ácido ascórbico reducido (ASA) como sustrato, y formando parte del ciclo conocido como el ciclo ascorbato-glutation o Halliwell-Asada (Foyer y Mullineaux, 1994; Inzé y Van Montagu, 1995). Por otro lado, uno de los antioxidantes más estudiados y poderosos es el ASA. La capacidad de donar electrones en un amplio rango de reacciones enzimáticas y no-enzimáticas hace del ASA el principal compuesto detoxificador de ROS en la fase acuosa, ya que puede directamente inactivar el anión superóxido, los radicales hidroxilo y el oxígeno singlete, y reducir el H_2O_2 a agua a través de la reacción APX (Noctor y Foyer, 1998; Blokhina *et al.*, 2003).

Además del sistema antioxidante, los solutos osmoprotectores son compuestos que pueden participar en los mecanismos de tolerancia e indicar la posible presencia de un estrés ambiental. La acumulación de solutos osmoprotectores como la prolina es importante en las respuestas al estrés, ya que protege a la estructura de las proteínas de la desnaturalización, estabiliza las membranas celulares mediante interacciones con los fosfolípidos, detoxifica los radicales hidroxilo y también puede ser usada como fuente de energía y N (Hare *et al.*, 1999; Claussen, 2005). Por otro lado, las diferentes situaciones de estrés que causan, directa o indirectamente, la acumulación de los ROS también están asociadas con la acumulación de azúcares solubles, que generalmente ha sido considerada como una respuesta de adaptación a las condiciones de estrés ambiental (Couée *et al.*, 2006). Por tanto, otro proceso observado bajo condiciones de elevadas temperaturas y radiación solar es la degradación de sacarosa a hexosas (glucosa y fructosa), que son precursores de muchos compuestos antioxidantes (Sánchez *et al.*, 2005; Carrari y Fernie, 2006).

Los invernaderos mediterráneos permiten producir en condiciones subóptimas un gran número de productos hortícolas a un bajo coste, mediante el uso de invernaderos poco tecnificados con un mínimo control climático (Castilla, 2003). Hoy día, la fuerte competitividad del mercado destaca la necesidad de aumentar la calidad de los productos hortícolas de invernadero mediante un mejor control climático, por lo que es necesario encontrar un

compromiso económico entre los mayores costes de los invernaderos mejorados y sus prestaciones agronómicas. Así, en el agrosistema mediterráneo de España existen varios modelos tecnológicos, invernaderos con diferente nivel de equipamiento con distintos costes y prestaciones agronómicas, entre los cuáles pueden optar los agricultores según las estrategias de producción elegidas en cada caso. Los modelos tecnológicos con perspectivas de futuro son dos: invernaderos tipo parral mejorado, de bajo coste y nivel tecnológico, e invernaderos tipo multitúnel industrial, de mayor coste y que permite niveles de equipamiento más completos. El invernadero parral mejorado no se emplea en ciclos de verano, mientras que el invernadero multitúnel permite extender el calendario de cultivo a épocas de alta radiación, al estar dotado de equipos de climatación adecuados.

El control de las condiciones climáticas en los invernaderos es un problema debido a la gran intensidad de la luz solar, a las elevadas temperaturas y al alto DPV del aire durante el verano, los cuáles podrían influir en la producción y desencadenar situaciones de estrés ambiental en los frutos de tomate cherry. Con el fin de evitar estas situaciones de estrés, en la actualidad se están introduciendo en la región mediterránea invernaderos de alta-tecnología, aunque su efecto sobre la fisiología del fruto es todavía desconocida en la mayoría de las plantas hortícolas. Por tanto, el objetivo de este capítulo fue comprobar cómo el control de estos factores ambientales (temperatura, radiación solar y DPV) influyeron sobre la producción, detoxificación de H_2O_2 y varios indicadores de estrés ambiental en frutos de tomate cherry cultivados en dos tipos de invernaderos mediterráneos experimentales: baja-tecnología (parral mejorado) y alta tecnología (multitúnel).

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.2.1. Descripción del área de ensayo.

A) Localización: Los ensayos se llevaron a cabo en la Estación Experimental La Nacla de la Caja Rural de Granada, que se encuentra ubicada dentro del término municipal de Motril (provincia de Granada, España). Su situación geográfica fue $36^{\circ} 45'$ Norte, $3^{\circ} 30'$ Este y a una altitud de 130 m sobre el nivel del mar.

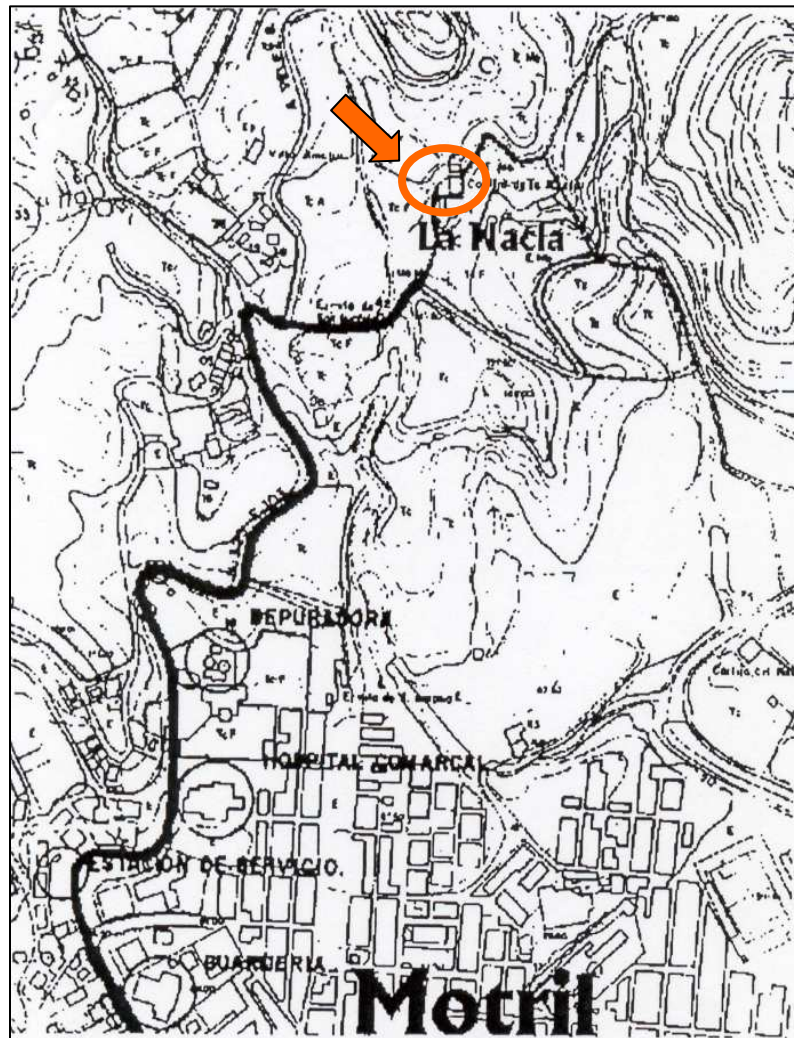


Figura 3.1. Situación de la Estación experimental La Nacla.

B) Características climáticas: El clima de esta zona está catalogado como Mediterráneo subtropical (MAPA, 1989). Su pluviometría media anual está por debajo de los 500 mm, constituyendo los meses de verano un periodo de sequía muy notable. No presenta riesgo de heladas en ningún periodo del año y su régimen de humedad es mediterráneo-seco (Papadakis, 1960). El régimen térmico se caracteriza por veranos calurosos e inviernos suaves, donde la temperatura media anual ronda los 18°C, la temperatura media de máximas absolutas anuales los 33°C y la temperatura media de las mínimas absolutas anuales los 2.5°C.

3.2.2. Descripción de los invernaderos experimentales.

Los ensayos se realizaron en dos sistemas productivos diferentes, un sistema de bajo nivel tecnológico frente a otro más sofisticado, con el objeto de realizar una comparativa a nivel agronómico (producción) y fisiológico entre los tomates cherry de ambos invernaderos.

3.2.2.1. Sistema de baja-tecnología: Invernadero parral mejorado.

Consiste en un invernadero multicapilla tipo parral mejorado, orientado longitudinalmente Este-Oeste, y con una pendiente de cubierta simétrica de 27° respecto a la horizontal. Este valor maximiza la transmisividad en la radiación en los meses invernales y disminuye el ángulo de incidencia a valores próximos a cero en fechas cercanas al equinoccio, coincidiendo con el señalado por Bailey y Richardson (1990) como pendiente óptima en invernaderos de cubierta plástica.

Consta de 3 módulos, cada uno con una anchura de 6 m, una longitud de 25 m, una altura de canal de 4 m y de cumbrera 5.5 m. La superficie de cada módulo fue de 150 m², siendo la superficie total del invernadero de 450 m². En el interior del invernadero se ha habilitó un pasillo de hormigón a lo

largo del módulo situado más al norte, junto a la ventana lateral y que ocupó 42 m², quedando como superficie real para el cultivo 408 m².

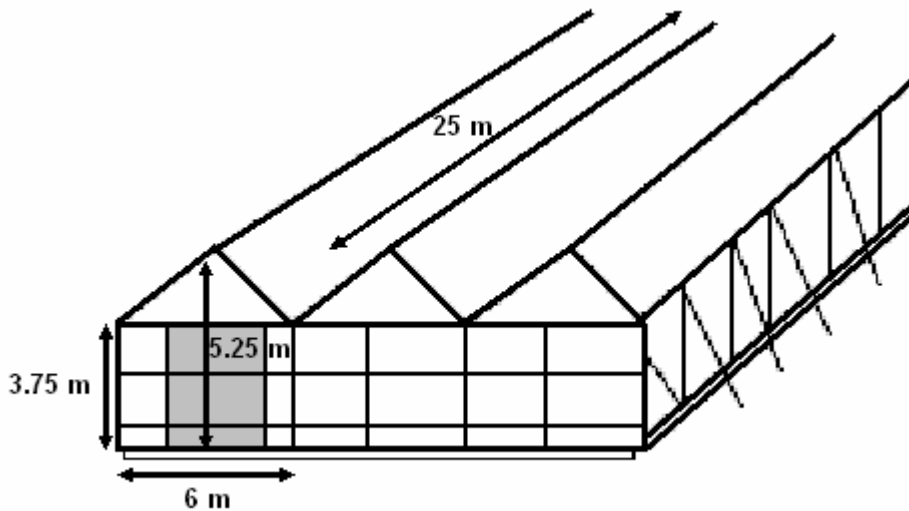


Figura 3.2. Estructura del invernadero de baja tecnología tipo parral mejorado.

La estructura perimetral estaba compuesta por un zuncho hormigonado, sobre el que se apoyó un ruedo exterior de soportes metálicos verticales formado por perfiles IPN de 12 cm de ancho x 6 cm de canto separados entre sí 2.8 metros en sentido longitudinal y 3 m en sentido transversal. La sujeción se completó con tirantes exteriores. La estructura vertical interna estaba formada por tubos metálicos de sección circular en las cumbreras y tirantes (alambres trenzados) en el canalón de desagüe, separados entre sí 3 m.

El tejido de cubierta fue doble, típica de los invernaderos tipo parral, con una malla exterior al plástico y otra interior entre las que queda sujeto. Cada una de estas mallas constaba de una red principal formada por alambre trenzado de 6 mm de diámetro y una malla secundaria de alambre sencillo de 2.5 mm en el caso de los alambres longitudinales y 2 mm de diámetro en el caso de los transversales (Fig. 3.2). La cuadrícula de alambre resultante presentaba una dimensión de 0.3 m x 0.2 m.



Imagen 3.1. Vista exterior (arriba) e interior (abajo) del invernadero experimental de baja-tecnología (parral mejorado) con el cultivo de los tomates cherry.

Para la sujeción del plástico lateral se utilizaron tres perfiles en U situados a 1.33 m del suelo, a 3.55 m y a la altura del canal, 3.75 m, respectivamente. El material quedaba sujeto al acoplar una goma en el perfil en U, de este modo se evitaba el punteo y rasgado del plástico, aumentando la hermeticidad de la estructura con respecto a las típicas de la zona.

El invernadero estaba dotado de un sistema de calefacción por generadores de aire caliente, distribuida por mangas de polietileno perforadas a nivel de cultivo.

La ventilación fue natural a través de ventanas laterales y cenitales de apertura automatizada. Las ventanas laterales eran enrollables situadas en los lados Norte y Sur, a 1 m de altura y con 2 m de apertura. Las ventanas cenitales situadas en la cara norte a lo largo del invernadero, también eran enrollables con una apertura de 1.5 metros de luz. La superficie de apertura respecto a la superficie de suelo era de 25% para las ventanas cenitales y del 22.22% para las laterales, sumando un 47.22% entre ambas.

3.2.2.2. Sistema de alta-tecnología: Invernadero multitúnel.

Se basa en un invernadero industrial tipo multitúnel, también orientado longitudinalmente Este-Oeste y trimodular. Cada módulo estaba constituido por 11 arcos de 6.4 metros de luz. La distancia entre dos arcos contiguos era de 2.5 m. Las dimensiones del invernadero fueron: 27.5 x 19.2 m de planta (superficie total 528 m², superficie de cada módulo 176 m²), con una altura al canalón de 4 m y a la cumbrera de 5.31 m. El pasillo del interior, también de hormigón y situado a lo largo del módulo norte, ocupaba 46.5 m², de forma que la superficie real para el cultivo fue de 482.25 m².

La estructura externa estaba formada por un muro perimetral de hormigón de 0.5 metros de altura sobre el que se insertaba la estructura metálica, de acero laminado en frío y galvanizado en caliente, prefabricada. Esta estaba constituida por pilares de sección circular que soportaban los arcos configurando una cubierta semicilíndrica, reforzada por varios tirantes y

correas. La unión entre las diferentes partes de la estructura se realizó mediante piezas de enlace preconformadas fabricadas por la misma empresa encargada de la construcción. La sujeción del material de cubierta a la estructura fue mediante perfiles omegas.

Este invernadero presentó un sistema de calefacción mediante caldera de gasoil por agua caliente conducida en tubería de acero con salto térmico posible de 20°C.

La ventilación natural se basó también en ventanas laterales a ambos lados y cenitales en el lado norte de cada módulo, a lo largo del invernadero, de apertura y cierre automatizado. Las ventanas laterales estaban situadas a 1.20 m del suelo con una apertura de 1.70 m. La apertura máxima de las cenitales era de 1.10 m de luz. La superficie total de apertura respecto a la superficie de suelo fue de 34,89% correspondiendo un 17.70% a las ventanas laterales y un 17.19% a las cenitales (-12,33% que el parral).

La ventilación forzada se realizó mediante 3 ventiladores helicoidales exteriores, instalados en el lateral del módulo norte. Estos introducían aire más fresco al interior del invernadero (36 ó 30 renovaciones h^{-1}) y se activaban bajo temperaturas superiores a entre 25 °C y 30 °C según la época del año.

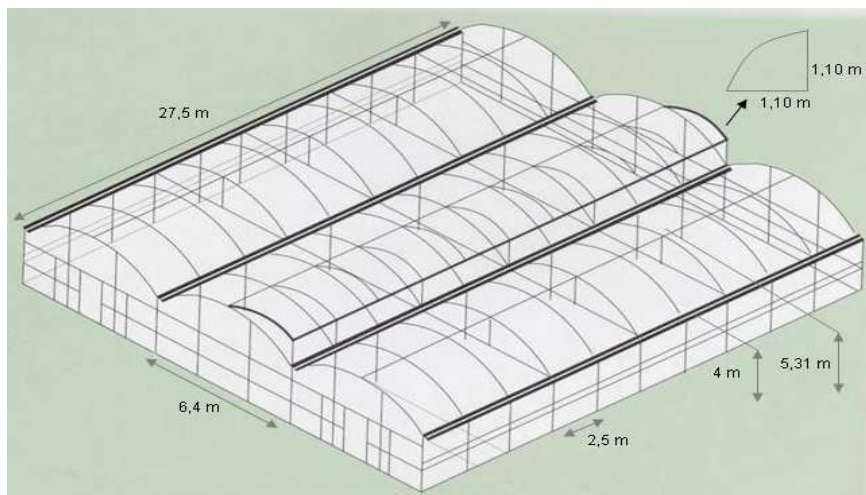


Figura 3.3. Estructura del invernadero de alta-tecnología tipo multitúnel.



Imagen 3.2. Vista exterior (arriba) e interior (abajo) del invernadero experimental de alta-tecnología (parral mejorado) con el cultivo de los tomates cherry.

A la altura de la canal se instalaron 3 ventiladores desestratificadores para agilizar la circulación interna del aire, que se activaban cuando la temperatura superaba los 22 °C; y un cuarto en la entrada de la antesala para dificultar el paso de una posible fuente de plagas al interior del invernadero, que se activaba con la apertura de la puerta.

Además se colocó una pantalla mixta LS PE 40 del 40% (térmica-malla de sombreo) móvil automatizada con sistema de tracción tubo-cremallera a 3.5 m de altura, usada en invierno para ahorrar energía de la calefacción y en los meses más calurosos para evitar altas temperaturas. El despliegue de la pantalla como malla de sombreo se producía para temperaturas superiores entre 20°C y 30°C, según la época y la intensidad de la radiación solar.

3.2.2.3. Otras características de los invernaderos.

El material de cubierta utilizado en ambos invernaderos fue un filme de polietileno tricapa PE-EVA-PE (Triplast de Plastimer) de 200 µm de espesor. La capa interior de PE era antigoteo y la exterior de larga duración. Este se colocó nuevo al inicio del ensayo (septiembre del 2003) y se cambió una vez durante el mismo, al finalizar el segundo año (julio del 2005). En los tres años, al llegar la primavera, el filme del invernadero parral se blanqueó con Blanco de España (Indalo Blanc) con el objeto de evitar un excesivo ascenso de las temperaturas. En el tercer año de cultivo esta operación se repitió a los 28 días porque tras el primer blanqueo llovió y se limpió la cubierta. En el invernadero multitúnel el ascenso de temperaturas se trató de controlar a través de la pantalla de sombreo y los ventiladores.

3.2.3. Material vegetal.

La especie vegetal utilizada ha sido tomate tipo cherry (*Solanum lycopersicum* L. cv Naomi), injertado sobre patrón "Maxiflor" de la casa Ruitter. Esta variedad de porta-injerto, usada también en berenjena, se caracteriza por su potente sistema radicular, su buen comportamiento a bajas temperaturas y en condiciones de salinidad, induciendo también un mayor vigor, producción y calibre de la fruta. Además, presenta resistencia a: ToMV (*tomato mosaic virus*), *fusarium 2*, *fusarium radici*, *verticillum*, corky-root, y nematodos. En cuanto al cultivar de tomate cherry utilizado (cv. Naomi), es de crecimiento indeterminado y larga vida, y se caracteriza por ser una planta vigorosa y de buena producción, para recolectar en ramo. Sus frutos se insertan en los racimos en forma de raspa, tienen mucho sabor y presentan buena consistencia y color. Resistente a *Fusarium* y *verticillum*.



Imagen 3.3. Racimo de frutos maduros de tomate cherry (cv. Naomi).

3.2.4. Diseño experimental y condiciones de crecimiento del cultivo.

El ensayo se llevó a cabo durante tres años consecutivos (del 2003 al 2006), en los que se realizaron tres campañas de ciclo largo que se extienden desde el otoño hasta la primavera. Para ello, las semillas de tomate cherry se sembraron en unas bandejas planas (tamaño de celda 3 cm x 3 cm x 10 cm, con 100 casillas por bandeja) rellenas con una mezcla de turba y vermiculita 50% (v/v), y se mantuvieron en un semillero durante 4 semanas (Saliplant S.L.; Carchuna, Granada). Transcurrido este tiempo, a finales de Septiembre, las plántulas se trasplantaron en los dos invernaderos experimentales de estudio, manteniendo el cultivo durante aproximadamente nueve meses.

En ambos invernaderos, las plantas crecieron en sacos rellenos de perlita (1.20 m de longitud, 40 L de volumen), siendo su disposición en el invernadero de 2 m de distancia entre líneas de cultivo y 0.2 m entre sacos de la misma línea, con una orientación Norte-Sur. El marco de plantación empleado fue de 2 m de distancia entre líneas de cultivo (pasillo ancho que facilita el paso para las operaciones de cultivo) y de 0.2 m entre sacos. En cada saco se colocaron 9 plantas (tres golpes con tres plantas cada uno), por lo que la densidad de plantación en ambos invernaderos fue de 3.21 plantas m⁻².



Imagen 3.4. Saco de perlita usado para el cultivo de tomate cherry.

El sistema de riego usado fue goteo localizado. Se instalaron tres goteros por saco dotados de piqueta, con un caudal 3 L h^{-1} a una presión de 1 Kg cm^{-2} . El criterio de riego fue en función del volumen de drenaje, manteniéndolo en torno al 20-25%.

El agua empleada para el riego proviene del Canal de la Cota 100, que es alimentado por el río Guadalfeo. Se realizaron varios análisis para conocer su contenido en los iones más importantes y su evolución a lo largo del ensayo. Su composición química media expresada en mmol L^{-1} fue la siguiente: 0.13 K^+ ; 1.62 Na^+ ; 1.595 Ca^{++} ; 1.525 Mg^{++} ; 0.69 SO_4^{2-} ; 2.07 Cl^- ; 0.03 NO_3^- ; 4.36 HCO_3^- ; 0 CO_3^{2-} . La conductividad eléctrica (CE) del agua fue de 0.69 mS cm^{-1} y el pH (20°C) de 7.77. Según las normas Riverside se trata de un agua C₂-S₁, de buena calidad, con bajo contenido en sodio, y apta para el riego (Cadahía, 2005).

La fertilización se realizó junto al riego. En los tres años de ensayo se siguió prácticamente el mismo patrón de aporte. La composición media de la solución nutritiva en mmol L^{-1} fue: 12 NO_3^- ; $1.75 \text{ H}_2\text{PO}_4^{2-}$; 1.5 SO_4^{2-} ; 6.25 K^+ ; 3.75 Ca^{2+} ; 0.5 Mg^{2+} . Los valores de CE se mantuvieron en torno a 2.3 mS cm^{-1} y el pH en 5.8.

Las plantas de tomate necesitan altos niveles de potasio durante el desarrollo de los frutos. El intercambio de este ión por protones provoca una bajada del pH de la solución que dificulta a la planta la absorción del magnesio. La deficiencia de este elemento provoca en las hojas necrosis y una clorosis internervial muy acusada, que aparece en las hojas más viejas y avanza rápidamente hacia las más jóvenes (Adams y Winsor, 1987). Con el objeto de evitar este desorden nutricional se realizó una modificación en el abonado aproximadamente 20 días antes del comienzo de la recolección. Se aumentaron los niveles de potasio y magnesio y se anuló prácticamente el ácido nítrico, subiendo el pH hasta 6.2 y la CE a 2.4 mS cm^{-1} .

La solución madre se preparó en dos tanques de 100 L cada uno y se inyectó con una abonadora proporcional en 10.000 L de agua de riego. Los abonos usados y las cantidades medias por cada m³ de agua han sido:

	<u>CANTIDAD (Kg)</u>	<u>TANQUE</u>
- Nitrato Potásico (13% N y 46% K ₂ O).....	22.5.....	A y B (1/2)
- Nitrato Cal Noruega (15.5% N y 26.5% CaO).....	75.0.....	A
- Sulfato magnesio (16% MgO y 13% S).....	12.5.....	B
- Sulfato potásico (51% K ₂ O y 18.5% S)	17.5.....	B
- Fosfato monopotásico (52% P ₂ O ₅ y 34% K ₂ O).....	23.5.....	B
- Micro Hortimix (*)	3.0.....	A

(*) El Hortimix es un compuesto de microelementos que contiene 0.7% B; 0.3% Cu; 7.5% Fe; 3.3% Mn; 0.2% Mo y 0.6% Zn.

En general las labores culturales que se han llevado a cabo durante los tres años de ensayo han sido las habituales de la zona. Las plántulas a los 30-35 días de la siembra en semillero, con 3 o 4 hojas verdaderas y unos 12 cm de altura, fueron trasplantadas en los sacos de perlita previamente puestos en capacidad de campo. Tras el trasplante se dio un riego a fin de conseguir una buena humedad en el entorno radicular y un buen contacto del cepellón trasplantado.

El tutorado de las plantas se realizó con el sistema de “gancho holandés descolgado”. El tutorado se sustentó en un entramado de alambre, solidario con la estructura del invernadero a una altura de emparrillado 2.5 m. Para cada planta se empleo un hilo de polipropileno (rafia) el cual de un lado se une a la zona basal de la planta liándolo al tallo mediante anillas, y del otro a un gancho que recoge enrollado el resto de hilo que irá soltándose al crecer la planta. Las plantas se han ido desplazando a lo largo de las líneas de cultivo, manteniendo las partes bajas tumbada junto al suelo, los tallos ligeramente inclinados y las porciones terminales hacia arriba con el fin de interceptar la máxima radiación solar (Nuez, 1995).

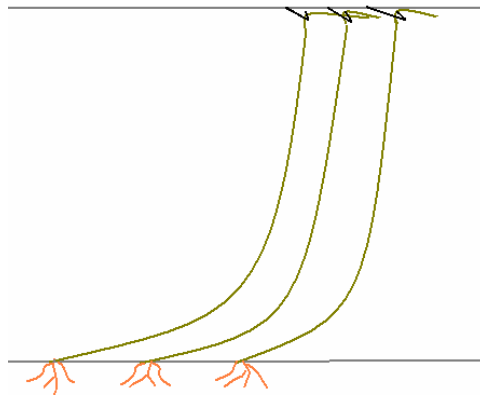


Imagen 3.5. Esquema del tutorado tipo “gancho holandés descolgado”.

El tipo de poda principal que se ha practicado en ambos invernaderos ha sido “poda a un tallo”. Consiste en eliminar todos los brotes auxiliares del tallo principal (tiempo entre destalle 12-15 días), permitiendo el crecimiento indefinido de la guía hasta su eventual despunte tras haber conseguido el número de inflorescencias deseado. En algunas plantas se práctico podas a “dos tallos” disponiendo de dos guías (la principal y la nacida del brote axilar). Esta medida se llevó a cabo sobre todo en el primer año (15 tallos más por línea), y en el segundo año en los últimos meses del cultivo para cubrir los huecos que dejaban las plantas arrancadas por la alta incidencia de virosis que se produjo.

El deshojado se realizó manteniendo solo con hojas la porción de tallo correspondiente a 4 ó 5 ramos cuajados, siendo la parte de la planta que estaba más iluminada. Además se fueron suprimiendo las hojas senescentes o enfermas para mejorar la aireación y la sanidad del cultivo. El pinzado de los tallos principales se llevó a cabo aproximadamente cuando se conseguían entre 25-30 ramos de flor, en función de la climatología de los ciclos. Para la polinización de las flores se emplearon abejorros (*Bombus terrestris*), susando unas 7 colmenas por invernadero y ciclo de cultivo. La recolección del tomate

fue manual cuando prácticamente la totalidad del ramo estaba maduro comercialmente.

Para controlar las plagas y enfermedades se realizaron tratamientos fitosanitarios preventivos aplicados mediante un equipo de nebulización electrónico (NEI-TEC 8000) que utiliza la técnica de ultra bajo volumen, produciendo una finísima niebla (espectro de gotas de 5 a 15 micras). Los agroquímicos utilizados en los tres ciclos han sido:

FUNGICIDAS	INSECTICIDAS	ACARICIDAS
Aliado	Atominal	Vertimec
Acrobat	Audace	Zufre
Bayfidan	Biosoap	Fosulan
Caddy 10 pepite	Calypso	Sanmite
Daconil	Nomolt	
Equation Pro	Plenum 25 WP	
Foltec-K	Lannate	
Proplant		
Scala		
Sumiclex		

Junto a estos tratamientos se aplicó Isabión, que es un nutriente biológico con efecto trasbordador de funguicidas, insecticidas, abonos y quelatos.

En ambos invernaderos las ventanas, tanto laterales como cenitales, se cubrieron con malla mosquitera del tipo Econet-L de 20 x 10 hilos cm^{-2} , para disminuir el paso de insectos, que aunque no constituyen problema alguno en cuanto a la luz que llega al cultivo si supone un notable efecto reductor de la tasa de ventilación. Además se utilizaron trampas cromáticas azules y amarillas colocadas a una densidad de 1 trampa por cada superficie de 4 m^2 .

A la entrada de cada invernadero se construyó una pequeña antesala, la cual contribuye a evitar la proliferación de plagas y enfermedades pues se trata de un punto crítico de entrada cuando se accede al interior. En el invernadero múltitunel, además, en dicha antesala se colocó un ventilador similar a los destratificadores colocados en el interior.

3.2.5. Caracterización microclimática.

Los invernaderos fueron supervisados a través de un controlador climático integro modelo 718 de la casa PRIVA, en el cual se almacenan los datos básicos de radiación, temperatura, y humedad ambiental. Las consignas climáticas fijadas se han establecido siguiendo el manejo usual de la zona para cada tipo de invernadero, y han sido:

- Parral Mejorado: Temperatura mínima para calefactar 10 °C
- Multitúnel: - Temperatura mínima para calefactar 14 °C
- DPV < 2 KPa

Para la toma de los parámetros climáticos básicos se utilizaron dos estaciones meteorológicas portátiles, que se instalaron en las parcelas de ensayo. Cada estación contaba con un datalogger (microordenador para adquirir datos) CR10X de la firma Campbell Sci, y un multiplexer de señal AM416, que permite al equipo realizar la toma simultánea de 32 lecturas distintas. Los equipos se programaron para tomar lecturas cada 10 minutos, y promediar y almacenar los valores cada media hora. Los datos se recogieron semanalmente a través de un ordenador portátil.

Las temperaturas del aire y la humedad fueron medidas mediante termohigrómetros de capacitancia HMP45C de Campbell SCI con sensor de humedad Vaisala HUMICAP 180. Su rango de medida fue de 0.8 a 100% de humedad relativa y su precisión fue de $\pm 2\%$ para el intervalo de 0 a 90% y $\pm 3\%$ para el intervalo de 90 a 100%. Se colocaron dos termohigrómetros en los módulos norte y sur de cada invernadero, y otro en el exterior, a un 1.5 m de altura del suelo protegidos con cápsulas para evitar la radiación solar pero dejando circular el aire. La temperatura de aire se ha expresado en °C y los valores higrométricos en % para la humedad relativa y en KPa para el DPV.

La radiación global se expresa en MJ m⁻², para los valores acumulados en cada día. Las medidas se tomaron mediante el uso de sensores

piranómetros puntuales (modelo SKS1110, Skye Instruments; Reino Unido), colocados a la altura del cultivo en el módulo central de cada tipo de invernadero. Estos piranómetros cuentan con una fotocélula de silicio sensible al espectro de luz comprendido entre 350-1100 nm. Su calibración se realizó frente a un piranómetro de referencia según la World Radiometric Reference, que lineariza la respuesta del sensor adaptándola a la longitud de onda entre 300 y 3000 nm. El error siempre estuvo por debajo del 5%, y en la mayoría de los casos fue inferior al 3%. El piranómetro de referencia usado fue un CM6B de la firma Kipp&Zonnen, de tipo cupular, el cual cuenta con 64 elementos sensores y permite lecturas en el rango 305-2.800 nm. Su error fue inferior al 1.5%.

3.2.6. Muestreo de los frutos.

El ciclo de producción de los tomates cherry duró aproximadamente desde Diciembre a Julio, donde un racimo completo de tomates (con 10-12 tomates por racimo) maduró cada 10 días. Los frutos de tomate cherry se muestrearon tres veces a lo largo de todo el ciclo de producción del cultivo: en los meses de Enero [16 semanas después del transplante (SDT)], Marzo (26 SDT) y Mayo-Junio (35 SDT), correspondientes respectivamente al inicio, mitad y final de la estación de cosecha, evitando así la primera cosecha y el periodo final de senescencia de las plantas. De las plantas se recogieron los tomates cherry de calidad comercial y con el mismo estado de maduración, descartando los frutos dañados y los verdes del final del racimo, los cuáles fueron seleccionados aleatoriamente en toda la superficie de cultivo en ambos invernaderos experimentales. Posteriormente, los frutos fueron llevados al laboratorio de Nutrición Vegetal del Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de Granada, donde fueron lavados tres veces con agua destilada después de una desinfección con Decon 90 (Merck) al 1% (Wolf, 1982) y secadas con papel de filtro seco. Los tomates cherry enteros fueron homogenizados y almacenados a -30°C, los cuáles se usaron para analizar los parámetros descritos a continuación.

3.2.7. Análisis vegetal.

3.2.7.1. Medida de la peroxidación de lípidos.

Para el ensayo del **malondialdehído** (MDA), 1.5 g de tomate cherry se homogenizó en 5 mL de una solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.25% en ácido tricloroacético (TCA) al 10%. El extracto vegetal resultante se calentó a 100°C durante 30 min y rápidamente se enfrió en un baño de hielo. Después de esto, las muestras se centrifugaron a 9500 rpm durante 10 min (4°C), y se registró la absorbancia del sobrenadante a 532 nm y a 600 nm. El valor de la absorción no específica a 600 nm se restó a la lectura de 532 nm. La concentración de MDA se calculó usando un coeficiente de extinción de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Fu y Huang, 2001; Cervilla *et al.*, 2007).

La actividad **lipo-oxigenasa** (LOX) se midió de acuerdo a Minguez-Mosquera *et al.* (1993), usando para la extracción un tampón 50 mM de fosfato potásico (pH 6.0), centrifugando posteriormente las muestras a 9500 rpm durante 20 minutos. La mezcla de reacción consistió en 0.2 mL de extracto y 4 mL de ácido linoleico 0.5 mM disuelto en un tampón fosfato potásico 50 mM (pH 6.0), que contenía Tween20 al 0.1%. La actividad LOX se calculó siguiendo el incremento en la absorbancia a 234 nm usando un coeficiente de extinción de 25.000 M⁻¹ cm⁻¹ (Egert y Tevini, 2002). El contenido de proteínas del extracto se midió de acuerdo con el método de Bradford (1976) utilizando BSA (albúmina de suero bovino) como estándar. La actividad se basó en la concentración de proteínas del extracto y se expresó en unidades (U) por miligramo de proteína, donde 1 U se define como una cantidad de enzima que utiliza 1 μmol ácido linoleico min⁻¹.

3.2.7.2. Contenido en ascorbato.

La cuantificación del contenido en ascorbato reducido (ASA) se realizó gracias a capacidad de reducción del Fe³⁺ a Fe²⁺ por este compuesto en un medio ácido. El ensayo del ascorbato total (ASA+DHA) se determinó mediante

el mismo procedimiento, mediante una reducción previa del dehidroascorbato (DHA) hacia ASA con dithiothreitol (DTT). El contenido en DHA se obtuvo de la diferencia de ambos ensayos (Gossett *et al.*, 1994).

Para la extracción, 1.5 g de tomate cherry se homogeneizó con 5 mL de ácido metafosfórico al 5% (p/v), el cuál se centrifugó a 13500 rpm durante 15 min a 4°C.

La determinación del ascorbato total se realizó mediante la siguiente mezcla de reacción: 0.2 mL de sobrenadante, 0.5 mL de buffer fosfato sódico 150 mM a pH 7.5 y 0.1 mL de DTT 25 mM. A continuación, los tubos se agitaron e incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 min. Pasado este tiempo, se adicionaron 0.1 mL de N-etilmaleimida al 0.5% (p/v), 0.4 mL de ácido trifluoroacético al 10% (v/v), 0.4 mL de ácido ortofosfórico al 44% (v/v), 0.4 mL de 2,2'-bipiridil al 4% (p/v) en etanol al 70% y 0.2 mL de FeCl₃ al 3% (p/v). A continuación, los tubos de ensayo se agitaron e incubaron a 40°C y en oscuridad durante 40 min. Por último, se procedió a la lectura de las muestras a una longitud de onda de 525 nm frente a una curva patrón de ASA (0.1-1.5 mM), la cuál siguió la misma metodología que las muestras vegetales.

Para determinar la concentración de ASA, el procedimiento a seguir fue idéntico al descrito anteriormente para el ascorbato total, con la única salvedad de que en la mezcla de reacción inicial no se adicionaron 0.1 mL de DTT 25 mM.

La concentración de DHA se obtuvo de la diferencia entre la concentración de ASA y ascorbato total. Las concentraciones de ASA, DHA y ascorbato total fueron expresadas en mmol g⁻¹ peso fresco (PF).

3.2.7.3. Contenido en H₂O₂

El ensayo está basado en el complejo que forma el H₂O₂ al reaccionar con el titanio (Ti⁴⁺). Este complejo desarrolla un color amarillo, el cual, tras la precipitación con hidróxido de amonio (NH₄OH aq), separa el H₂O₂ del resto de hidroperóxidos. Por último, el complejo formado (precipitado), al resuspenderse en una solución de ácido sulfúrico [TiO₂(SO₄)₂²⁻], puede medirse por colorimetría (Brennan y Frenkel, 1977).

Para la extracción, una cantidad aproximada de 2 g de material vegetal se homogenizó en 7.5 mL de acetona fría. El extracto fue filtrado y centrifugado a 3500 rpm durante 5 min a 4°C y el sobrenadante resultante fue utilizado para la determinación de la concentración en H₂O₂.

Para la determinación, 1.5 mL del sobrenadante se mezcló con 0.2 mL de TiCl₄ al 20% (v/v) en 2 M ClH, agitándose enérgicamente, y posteriormente con 1 mL de NH₄OH al 20% (p/v), mezclándose minuciosamente gota a gota. La mezcla resultante se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó varias veces con acetona fría (empleando un volumen aproximado de 5 mL), hasta que el nuevo sobrenadante formado quedaba decolorado. El precipitado se resuspendió en 4 mL de H₂SO₄ 2M. A los 15 min, se adicionaron 3 mL de H₂O desionizada y la solución obtenida se filtró en embudos de papel. Por último, se procedió a la lectura de las muestras a una longitud de onda de 415 nm, frente a una curva patrón de H₂O₂. La concentración obtenida fue expresada en μmol H₂O₂ g⁻¹ PF.

3.2.7.4. Enzimas antioxidantes.

La actividad **superóxido dismutasa** (SOD; EC 1.15.1.1) fue determinada mediante la inhibición de la reducción fotoquímica del azul de nitrotetrazolio (NBT). La extracción y cuantificación de la enzima SOD se realizó siguiendo el método de Giannopolitis y Ries (1977) y Beyer y Fridovich (1987) con algunas modificaciones (Yu *et al.*, 1998) optimizado para nuestras condiciones. La extracción se realizó homogenizando 1.5 g de tomate cherry en

5 mL de un tampón Heppes-ClH 50 mM pH 7.6 que contenía 0.1 mM EDTA-Na₂. Seguidamente, el homogeneizado se centrifugó a 11000 rpm a 4 °C durante 10 min. Para la determinación de la actividad SOD se realizó un tampón de reacción 50 mM Na₂CO₃-NaHCO₃ a pH 10.2, que contenía 0.1 mM EDTA-Na₂, 12 mM L-metionina, 0.075 mM NBT y 0.002 mM riboflavina. Posteriormente, el ensayo de las muestras se realizó de la siguiente manera:

1. Blanco: 0.2 mL de tampón de extracción y 5 mL de tampón de reacción.
2. Controles y muestras: 0.2 mL de extracto enzimático y 5 mL de tampón de reacción.

Seguidamente, todos los tubos se agitaron y se guardaron en oscuridad. A continuación, se procedió a la lectura de los tubos a una longitud de onda de 560 nm (T_0) en el siguiente orden: blanco, controles y muestras. Posteriormente, los controles se guardaron en oscuridad, y el blanco y las muestras fueron iluminadas durante 15 min con una intensidad lumínica de 380 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$, mediante una lámpara de luz azul (OSRAM, 40 watos). Transcurridos los 15 min, se midieron de nuevo el blanco, los controles y las muestras, en el mismo orden y a la misma longitud de onda (T_{15}). El contenido de proteínas del extracto se midió de acuerdo con el método de Bradford (1976) utilizando BSA como estándar. La actividad SOD fue expresada como U mg^{-1} proteína min^{-1} , donde 1 U se define como la cantidad de enzima requerida para causar el 50% de la inhibición de la reducción de NBT monitorizado a 560 nm.

La determinación de la actividad **catalasa** (CAT; EC 1.11.1.6) está basada en la capacidad de oxidación del H₂O₂ por la CAT a lo largo del tiempo, y se realizó siguiendo el método de Kalir *et al.* (1984) y Badiani *et al.* (1990) modificado y optimizado para nuestras condiciones. Para la extracción de esta enzima se tomó una cantidad aproximada de 1.5 g de material vegetal y se homogeneizó con 5 mL de tampón Heppes-ClH 25 mM pH 7.8. El extracto vegetal resultante fue filtrado y centrifugado a 11500 rpm a 4°C durante 20 min. El sobrenadante obtenido fue utilizado para medir la actividad CAT. La mezcla

de reacción para la determinación de la actividad CAT consistió en: 0.75 mL de tampón fosfato sódico 25 mM ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$) pH 7, 0.75 mL de EDTA- Na_2 0.8 mM, 1 mL de H_2O_2 20 mM y 0.5 mL de extracto enzimático. Seguidamente, y tras agitar los tubos, se procedió a la lectura de las muestras a una longitud de onda de 240 nm, siguiendo la variación de la absorbancia en el tiempo. El contenido de proteínas del extracto se midió de acuerdo con el método de Bradford (1976) utilizando BSA como estándar. La actividad fue expresada como $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ oxidados mg^{-1} proteína min^{-1} .

El ensayo de la actividad **ascorbato peroxidasa** (APX; EC 1.11.1.11) se realizó siguiendo los métodos de Gosset *et al.* (1994) y Rao *et al.* (1996), con algunas modificaciones. Para la extracción de la enzima, 1.5 g de tomate cherry fue homogeneizado con 5 mL de tampón fosfato potásico ($\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$) 100 mM pH 7.5 que contenía 1 mM de EDTA- Na_2 . El extracto resultante fue filtrado y centrifugado a 12000 rpm durante 20 min. La determinación de la actividad APX se estimó siguiendo la oxidación del ASA debida a la actividad de esta enzima a lo largo del tiempo. La mezcla de reacción para la determinación de esta actividad fue la siguiente: 1.5 mL de tampón fosfato sódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$) 100 mM pH 7.5, 0.75 mL de H_2O_2 0.2 mM, 0.75 mL de ascorbato sódico 0.5 mM y 0.75 mL de extracto enzimático para iniciar la reacción. Seguidamente, y tras agitar los tubos, se procedió a la lectura de los mismos a una longitud de onda de 290 nm, siguiendo la variación de la absorbancia en el tiempo. El contenido de proteínas del extracto se midió de acuerdo con el método de Bradford (1976) utilizando BSA como estándar. La actividad se expresó como nmol ASA oxidado mg^{-1} proteína min^{-1} .

3.2.7.5. Contenido en prolina y azúcares.

La determinación de **prolina** se realizó siguiendo el método propuesto por Irigoyen *et al.* (1992), optimizado para nuestras condiciones. Una cantidad de aproximadamente 1.5 g de tomate cherry fue homogeneizado con 5 mL de etanol absoluto y, posteriormente, se lavó dos veces con 2.5 mL de etanol al 70%, hasta alcanzar un volumen final de extracción de 10 mL. El homogeneizado fue centrifugado a 5500 rpm durante 10 min y el sobrenadante

resultante se utilizó para la determinación de la concentración de prolina. Para la cuantificación de este aminoácido, se realizó una mezcla de reacción compuesta por: 2 mL del extracto vegetal, 3 mL de agua desionizada, 2.5 mL de reactivo de ninhidrina (6.25 g ninhidrina + 100 mL ácido fosfórico 6 M + 150 mL ácido acético glacial) y 2.5 mL de ácido acético glacial. Posteriormente, los tubos fueron agitados e introducidos en un baño de agua termostetizado a 100°C durante 45 min. Transcurrido este tiempo, los tubos se introdujeron en un baño de hielo y se le añadió a cada uno de ellos 5 ml de benceno. Los tubos fueron agitados vigorosamente durante 1 min cada uno. Tras 15 min, se procedió a la lectura espectrofotométrica a 515 nm de la fase líquida más elevada en el tubo frente a un patrón de prolina. La concentración de prolina fue expresado como $\mu\text{g g}^{-1}$ PF.

Las concentraciones en **sacarosa, D-glucosa y D-fructosa** se determinaron mediante el uso de ensayos enzimáticos comerciales (R-Biopharm, Francia), en los cuáles se midió la formación de NADPH a 340 nm, de acuerdo a lo descrito en el protocolo de cada ensayo. El contenido en hexosas se determinó de la suma de las concentraciones en D-glucosa y D-fructosa. Las concentraciones de los azúcares fueron expresados como mg g^{-1} PF.

3.2.7.6. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias se compararon mediante el test de rango múltiple de Duncan (DMRT; $P < 0.05$). Los valores obtenidos de cada parámetro corresponden a la media de los tres años de estudio (2004, 2005 y 2006). Además, para determinar si el tipo de invernadero experimental y el tiempo de muestreo influyó significativamente en los resultados, se utilizó una ANOVA de dos vías y las medias fueron comparadas mediante el test de diferencias significativas mínimas de Fisher (LSD). Los niveles de significación se han representado mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.3.1. Descripción de las condiciones ambientales en ambos invernaderos y sus efectos sobre la producción.

Los valores de las temperaturas máximas del aire en el interior de los dos invernaderos experimentales aumentaron en el tercer muestreo (35 SDT), siendo en el invernadero parral más elevadas que en el multitúnel durante todo el periodo productivo (Fig. 3.4.A). Sin embargo, a pesar de que las temperaturas mínimas de aire incrementaron ligeramente a las 35 SDT, este incremento fue muy similar en ambos invernaderos durante el ciclo productivo (Fig. 3.4.A). En relación a la radiación solar, los resultados obtenidos mostraron un incremento progresivo hasta un máximo producido durante el tercer muestreo de la cosecha, siendo mayor en el invernadero parral durante todo el ciclo del cultivo (Fig. 3.4.B). Finalmente, el DPV máximo del aire, al igual que los valores de temperatura y radiación solar, también incrementó sucesivamente a lo largo del periodo productivo, alcanzando los valores más elevados al final de la cosecha (35 SDT), y siendo más pronunciado en el invernadero parral durante todo el periodo de estudio (Fig. 3.4.C).

Al final del ciclo de producción, las temperaturas en ambos invernaderos excedieron el óptimo de crecimiento del tomate, el cuál está definido entre 23 y 26°C (Maroto, 1995), coincidiendo con un aumento en los valores de radiación solar y DPV, por lo que en nuestro experimento se podrían haber desencadenado ciertos desórdenes metabólicos y fisiológicos que afecten a la producción en el último muestreo (Boyer, 1982). A pesar de que estas condiciones podrían inducir una situación de estrés abiótico en el interior de los invernaderos, no encontramos una reducción significativa en la producción total de tomates cherry en ambos invernaderos al final del periodo de estudio (35 SDT; Fig. 3.5.A). No obstante, si se encontró una reducción significativa en la producción comercial en el tercer muestreo en el invernadero parral (Fig. 3.5.B), coincidiendo con los mayores valores de temperatura, radiación solar y DPV, al contrario que en el invernadero multitúnel en el cuál no se encontraron

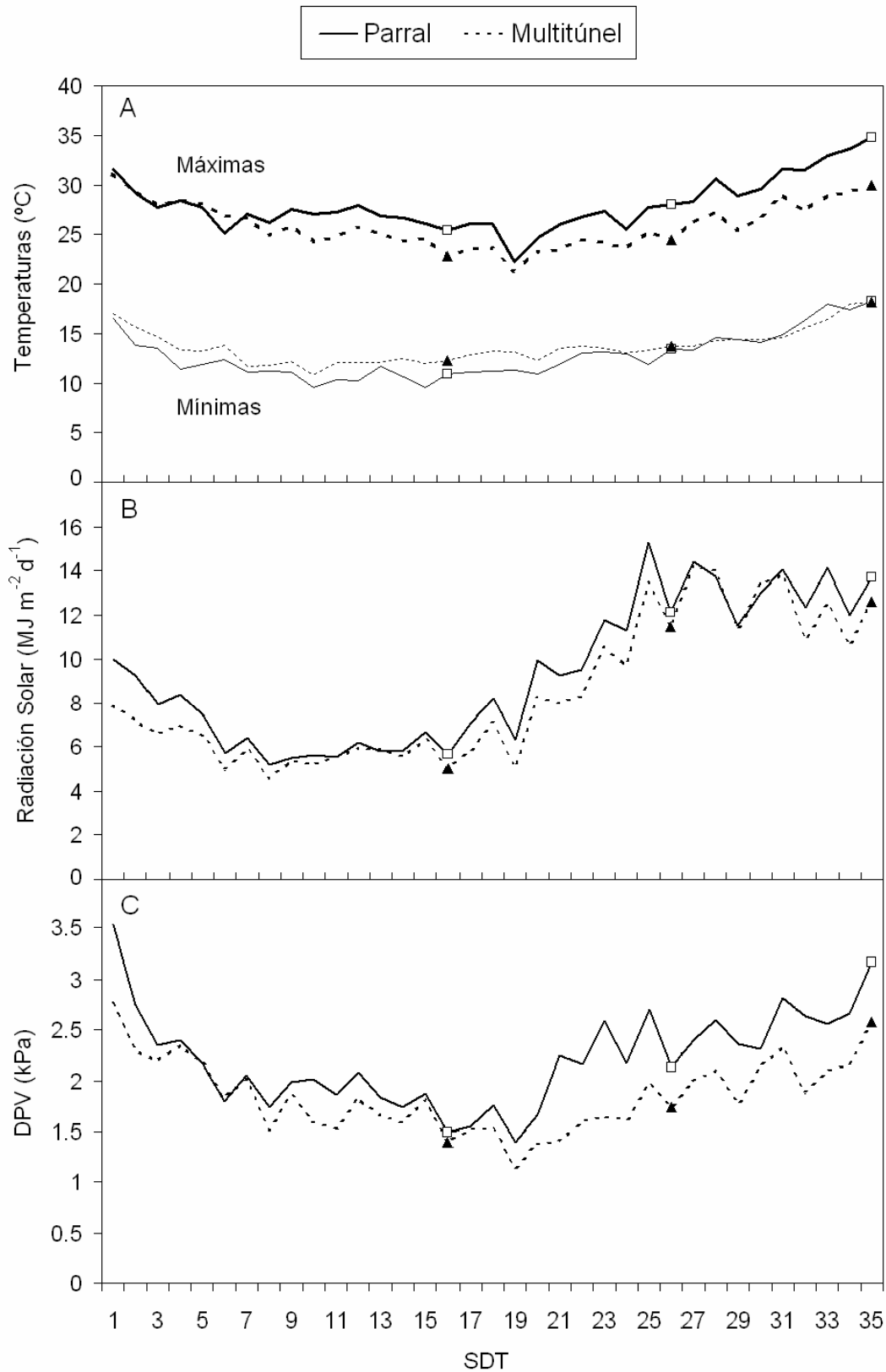


Figura 3.4. Valores de temperaturas máximas y mínimas, radiación solar y DPV máximo del aire en el interior de los dos invernaderos experimentales durante el ciclo de cultivo. Los 3 muestreos son marcados como: □ en el parral, y ▲ en el multitúnel.

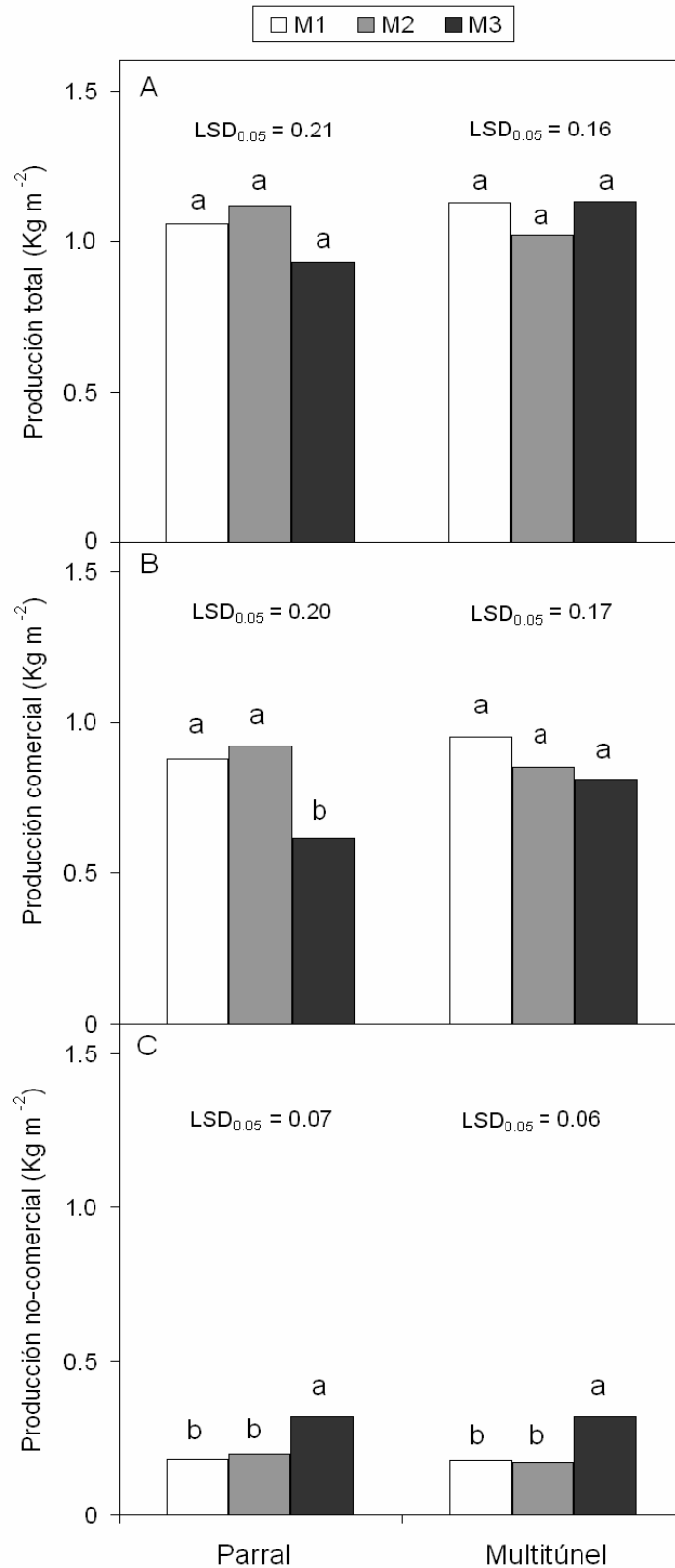


Figura 3.5. Producción de tomates cherry cultivados en los dos invernaderos experimentales en tres periodos diferentes de producción. Los valores seguidos con las mismas letras en cada invernadero no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

diferencias significativas durante todo el periodo productivo (Fig. 3.5.B). Además, en el tercer muestreo (35 SDT) se produjo un incremento en la producción no-comercial de frutos de tomate cherry en ambos invernaderos (Fig. 3.5.C). De hecho, nuestros resultados de producción total no concuerdan con los obtenidos por Rainwater *et al.* (1996) y Adams *et al.* (2001), quienes informaron de pérdidas en la producción en plantas de tomate cuando la temperatura del aire excedió los 26°C, excepto en el caso del invernadero parral mejorado donde sí se produce una reducción en la producción comercial durante el tercer muestreo (Fig. 3.5). Aunque bajo estas condiciones no se produjo una reducción significativa en la producción total de los tomates cherry, este incremento en la producción no-comercial al final del periodo productivo, y más concretamente en el invernadero parral, puede indicar la posible presencia de una situación de estrés abiótico producido por el aumento de la temperatura, radiación solar y DPV (Fig. 3.4), la cuál podría desencadenar una serie de respuestas fisiológicas y metabólicas que producirían una reducción en la calidad nutricional de los frutos de tomate cherry.

En la Fig. 3.6 se muestra el valor medio de producción total, comercial y no-comercial en los dos invernaderos de estudio. Al comparar estos valores de producción entre ambos invernaderos, observamos cómo no se obtienen diferencias estadísticamente significativas entre ellos, tanto en la producción total como en la producción comercial y no-comercial. Sin embargo, al observar la suma de los valores de producción acumulada obtenidos durante los tres años de estudio (Fig. 3.7), podemos observar cómo a lo largo del periodo de producción del cultivo en el invernadero multitúnel se obtuvieron los valores más elevados de producción total y comercial (Fig. 3.7.A,B), y los valores más bajos de producción no-comercial (Fig. 3.7.C), en comparación con el invernadero parral. A pesar de que estadísticamente no se reflejaron diferencias significativas entre ambos invernaderos durante los tres periodos de muestreo, es importante destacar una ganancia de 23.6 t ha⁻¹ de tomates cherry de calidad comercial producida en el invernadero multitúnel durante tres años en comparación con el parral, que desde un punto de vista agronómico es un beneficio más que evidente.

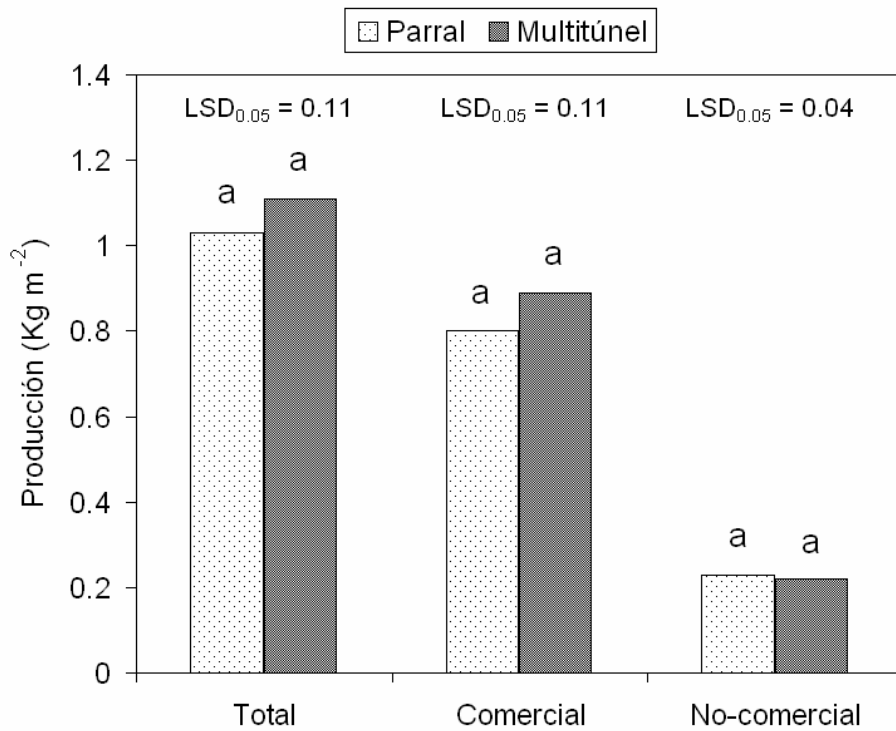


Figura 3.6. Comparación de la producción media de tomates cherry cultivados en los dos invernaderos experimentales durante el periodo productivo. Los valores seguidos con las mismas letras en cada invernadero no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

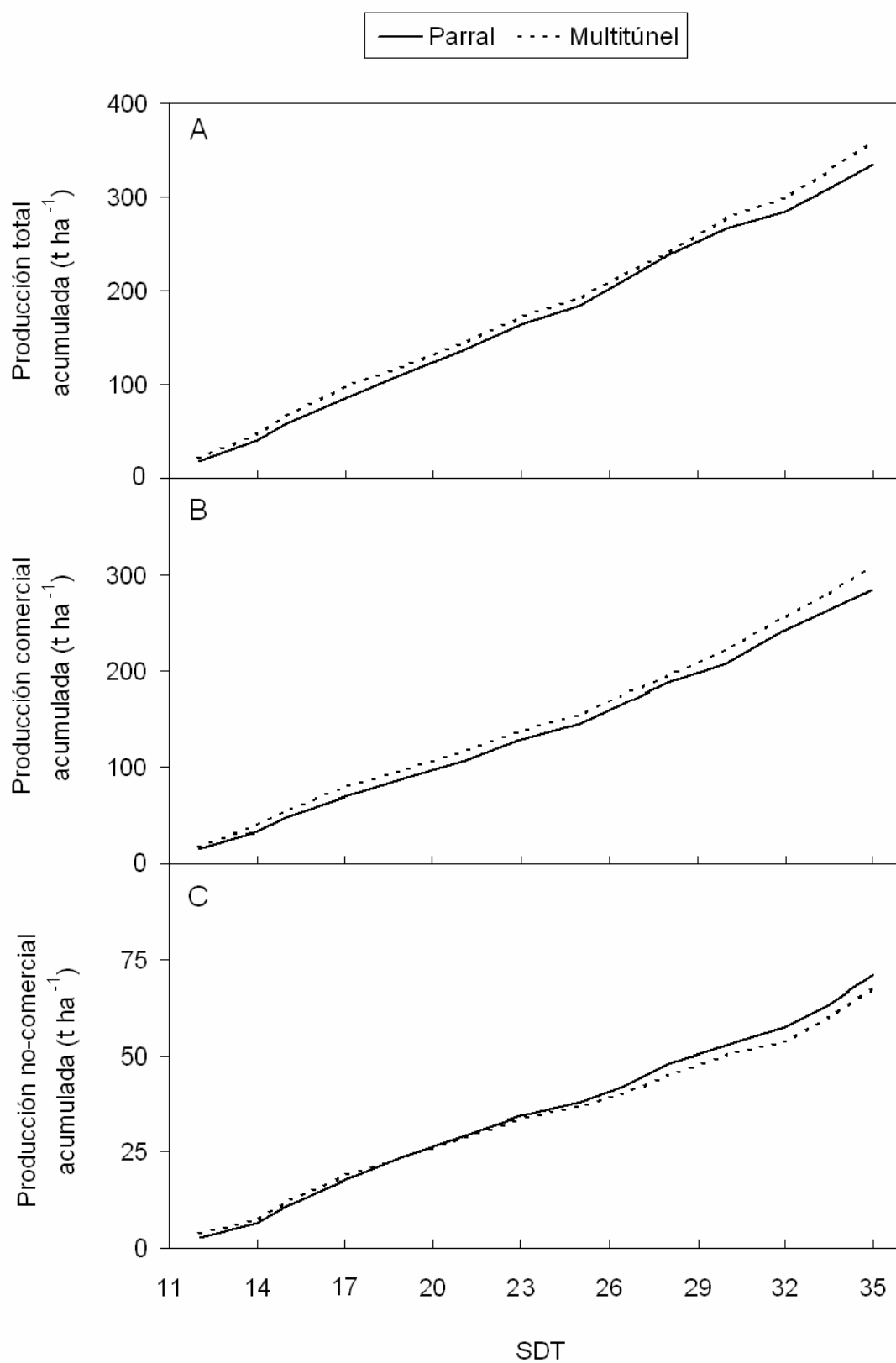


Figura 3.7. Producción acumulada de tomates cherry cultivados en los dos invernaderos experimentales correspondiente a la suma los tres años de estudio.

3.3.2. Efectos de las condiciones ambientales sobre la peroxidación de lípidos.

Bajo un estrés ambiental, la generación de ROS es responsable de un daño a las macromoléculas y finalmente a la estructura celular (Mittler, 2002). El análisis de la peroxidación de lípidos, expresada como actividad LOX y contenido en MDA, indica el predominio y activación de esos ROS en los tejidos como consecuencia del estrés oxidativo (Fu y Huang, 2001). Así, existen muchos estudios que definen a la peroxidación de lípidos como un indicador muy fiable para comprobar la presencia de cualquier tipo de estrés abiótico (Cervilla *et al.*, 2007; Koka *et al.*, 2007; Wahid *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Paradiso *et al.*, 2008). La peroxidación de lípidos es un proceso metabólico natural producido bajo condiciones normales, siendo una de las consecuencias más estudiadas de la acción de los ROS sobre la estructura y funcionalidad de la membrana (Smirnoff, 1995). Este proceso se produce por la peroxidación de los ácidos grasos poli-insaturados, que son los principales componentes de las membranas lipídicas. Así, la reacción LOX es una posible fuente de ROS y otros radicales, ya que cataliza la hidroperoxidación de los ácidos grasos poli-insaturados (Rosahl, 1996), lo cuáles pueden sufrir una degradación autocatalítica produciendo radicales e iniciando la reacción en cadena de la peroxidación de lípidos. Además, se ha mostrado la formación mediada por la LOX de oxígeno singlete y superóxido (Blockina *et al.*, 2003).

Nuestros resultados indican que tanto el contenido en MDA como la actividad LOX aumentaron en el tercer muestreo en ambos invernaderos (Tabla 3.1), coincidiendo con los valores más elevados de temperatura, radiación solar y DPV (Fig. 3.4). Además, los tomates cultivados en el invernadero parral mostraron unos valores de peroxidación de lípidos (contenido en MDA y actividad LOX) significativamente superiores al invernadero multitúnel durante todo el periodo productivo (Tabla 3.1), lo que podría indicar la presencia de unas condiciones ambientales que inducen una mayor situación de estrés oxidativo en los frutos de tomate cherry cultivados en su interior. El aumento en la peroxidación de lípidos en el tercer muestreo, principalmente en el invernadero parral, indica un posible estrés oxidativo provocado por el

incremento en las temperaturas, radiación solar y DPV, lo que puede desencadenar una serie de desórdenes metabólicos y fisiológicos que pueden producir una reducción en la producción o la aparición de ciertas fisiopatías del tomate cherry que aumentaría la producción no comercial del cultivo como ocurre en nuestro caso en el invernadero parral (Fig. 3.5).

Tabla 3.1. Peroxidación de lípidos en los frutos de tomate cherry cultivados en los dos invernaderos experimentales durante tres periodos diferentes de producción.

	MDA (nmol g ⁻¹ PF)		LOX (μmol mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)	
	Parral	Multitúnel	Parral	Multitúnel
Muestras				
M1	14.9 b ¹	13.3 b	7.40 b	7.76 b
M2	14.6 b	13.9 b	9.91 b	5.31 c
M3	19.1 a	17.5 a	14.6 a	11.8 a
<i>P</i> -valor ²	***	***	***	***
LSD _{0.05}	1.02	1.47	2.38	1.61
Invernaderos				
Parral	16.2 a		10.6 a	
Multitúnel	14.9 b		8.30 b	
<i>P</i> -valor	***		**	
LSD _{0.05}	0.71		1.39	

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

3.3.3. Condiciones ambientales en relación al contenido en ascorbato y enzimas de detoxificación del H₂O₂

En las plantas superiores, el ascorbato es uno de los antioxidantes más estudiados y poderosos gracias a su capacidad de donar electrones (Smirnoff, 1996). Este compuesto, está involucrado de forma directa en la eliminación de superóxido, radicales hidroxilo y de oxígeno singlete, y se le atribuyen una serie de funciones en la fotosíntesis: regeneración de los radicales α -tocoferol producidos cuando el α -tocoferol reduce los radicales peroxilo lipídicos, donación de electrones al fotosistema II mediante el ascorbato del lumen, y cofactor de la violoxantina de-epoxidasa involucrada en la disipación dependiente de zeaxantina del exceso de energía de excitación (Asada, 1994; Smirnoff, 1996). Además, el ascorbato también interviene en el metabolismo celular y en el control del crecimiento (Navas y Gomez-Diaz, 1995), en la división celular (Kerk y Feldman, 1995), en la expansión de la pared celular (Takahama y Oniki, 1994) y en la organogénesis (Joy *et al.*, 1988). Debido a su gran capacidad antioxidante y reductora, el ascorbato generalmente se encuentra en concentraciones muy elevadas en los tejidos vegetales (0.2-2 mM en frutos, raíces y hojas), localizándose preferentemente en los cloroplastos, en el citosol o en el espacio apoplástico (Karpinski *et al.*, 1993). Por tanto, el ascorbato ha sido estudiado de manera intensa como un importante agente reductor y antioxidante en relación con diversos factores de estrés ambiental (Levitt, 1980; Smirnoff, 1996; Blokhina *et al.*, 2003; Rivero *et al.*, 2004a).

Como refleja la Tabla 3.2, la concentración de ascorbato total y ASA incrementó significativamente en el tercer muestreo (35 SDT) con respecto a los muestreos previos en ambos invernaderos, coincidiendo con las condiciones de estrés ambiental producido por el incremento en la temperatura, radiación solar y VPD (Fig. 3.4). Además, observamos cómo en el tercer muestreo se produjo un ligero incremento en el contenido en DHA en el invernadero parral, coincidiendo también con los valores más elevados de ascorbato total y ASA (Tabla 3.2). Dado que el ASA puede directamente detoxificar ROS y está involucrado en la eliminación de ROS a través del ciclo ascorbato/glutation (Noctor y Foyer, 1998), el incremento en la concentración

de ascorbato en los frutos de tomate cherry sugiere un papel importante de este antioxidante frente al estrés oxidativo provocado por un estrés ambiental. Al comparar ambos invernaderos, observamos cómo los tomates cherry cultivados en el invernadero tipo parral mejorado tenían un mayor contenido tanto en ascorbato total como en ASA durante todo el ciclo productivo (Tabla 3.2), coincidiendo con los mayores valores de los parámetros ambientales (Fig. 3.4) y de peroxidación de lípidos (Tabla 3.1), lo cuál nos indica posiblemente el desarrollo de mecanismos de defensa antioxidante ante la presencia de una mayor exposición a condiciones ambientales desfavorables que pueden desencadenar en una situación de estrés oxidativo. Bajo condiciones similares, Raffo *et al.* (2006) no correlacionan un incremento en el contenido en ascorbato con los mayores valores de radiación solar y temperatura media registrados durante el periodo de cultivo en frutos de tomate cherry (cv Naomi).

Tabla 3.2. Contenido en ascorbato total, ASA y DHA en los frutos de tomate cherry cultivados en los dos invernaderos experimentales durante tres periodos diferentes de producción.

	Ascorbato total (mmol g ⁻¹ PF)		ASA (mmol g ⁻¹ PF)		DHA (mmol g ⁻¹ PF)	
	Parral	Multitúnel	Parral	Multitúnel	Parral	Multitúnel
Muestras						
M1	0.90 c ¹	0.84 b	0.68 c	0.60 b	0.22 b	0.24 a
M2	1.21 b	0.94 b	0.96 b	0.71 b	0.25 b	0.23 a
M3	1.75 a	1.33 a	1.35 a	1.03 a	0.40 a	0.30 a
<i>P</i> -valor ²	***	**	***	**	***	NS
LSD _{0.05}	0.29	0.27	0.26	0.23	0.11	0.12
Invernaderos						
Parral	1.29 a		1.00 a		0.29 a	
Multitúnel	1.04 b		0.78 b		0.26 a	
<i>P</i> -valor	**		**		NS	
LSD _{0.05}	0.16		0.15		0.07	

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Rivero *et al.* (2004a), donde se observó un incremento en el contenido en ascorbato total y ASA en plantas de tomate sometidas a estrés por calor (35°C). Por otro lado, Toor *et al.* (2006) mostraron en su estudio que una elevada radiación solar tenía un efecto positivo sobre la acumulación de los mayores compuestos antioxidantes (como el ácido ascórbico) en frutos de tomate.

El contenido en H₂O₂ en plantas y frutos se ha correlacionado con la aparición de condiciones ambientales adversas (Blokhina *et al.*, 2003; Rivero *et al.*, 2004a), y en nuestro análisis (Tabla 3.3) el H₂O₂ aumentó en los frutos de tomate cherry bajo condiciones de elevada temperatura, radiación solar y DPV (35 SDT; Fig. 3.4), coincidiendo con el incremento en la peroxidación de lípidos y en el contenido en ascorbato descritos antes, indicando un aumento en la actividad oxidativa en este periodo en ambos invernaderos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al contenido en H₂O₂ entre los dos invernaderos (Tabla 3.3).

Para controlar los niveles de ROS y proteger a las células bajo condiciones de estrés, los tejidos vegetales contienen varias enzimas antioxidantes. El primer paso enzimático en esta respuesta antioxidante lo lleva a cabo la SOD mediante la dismutación del O₂^{•-} para producir H₂O₂. Esta reacción tiene una velocidad 10000 veces mayor a la dismutación espontánea (Bowler *et al.*, 1992). Se han encontrado tres isoenzimas de SOD, concretamente Mn-SOD, Cu/Zn-SOD y Fe-SOD. Estas isoenzimas son de codificación nuclear, y se ha mostrado que los genes SOD son sensibles a los estreses ambientales, posiblemente como consecuencia de un incremento en la formación de ROS bajo varias condiciones de estrés ambiental (sequía, salinidad y temperaturas extremas) (Yu y Rengel 1999; Blokhina *et al.*, 2003). Los niveles intracelulares de H₂O₂ están regulados por un amplio rango de enzimas, siendo las más importantes la CAT y las peroxidasas (APX) (Willekens *et al.*, 1995). La CAT funciona a través de un complejo intermediario CAT-H₂O₂ (Componente I) que produce agua y O₂ (acción catalasa), que puede descomponerse formando el Componente II inactivo. En presencia del sustrato adecuado, el Componente I es mucho más efectivo y conduce la

reacción de peroxidación (Elstner, 1987). Finalmente, la APX tiene una gran importancia ya que está involucrada de forma directa en la eliminación de ROS a través del ciclo ascorbato/glutathione o ruta de Halliwell-Asada (Halliwell y Gutteridge, 1989), y por lo tanto su metabolismo es determinante en las respuestas de adaptación a diferentes tipos de estrés. El compuesto principal de este ciclo es el ASA, que gracias a la actuación de la enzima APX, es capaz de inactivar directamente el H_2O_2 generando monodehidroascorbato (MDHA; Asada, 1994; Foyer y Noctor, 2005).

Para estudiar la respuesta antioxidante, en este experimento se analizó la actividad de estas enzimas antioxidantes (SOD, CAT y APX) en los frutos de tomate cherry. En el tercer muestreo (35 SDT), la actividad de las enzimas SOD, CAT y APX incrementó significativamente en los tomates cherry cultivados en ambos invernaderos con respecto a los otros muestreos (Tabla 3.3). Este comportamiento parece sugerir que la acumulación de H_2O_2 podría ser debida en gran parte al aumento en la actividad SOD durante el tercer muestreo. En plantas de tomate bajo condiciones de alta temperatura ($35^{\circ}C$), Rivero *et al.* (2004a) observaron cómo se produjo una gran acumulación de H_2O_2 relacionada con un aumento en la actividad SOD, y una disminución en las actividades CAT y APX lo que se explicaba por una inactivación enzimática por las altas temperaturas y una carencia en la tolerancia al calor en las plantas de tomate. En nuestro experimento, aunque no se observaron diferencias significativas en cuanto al contenido en H_2O_2 y la actividad SOD entre ambos invernaderos, la mayor actividad de las enzimas CAT y APX en los tomates cherry cultivados en el invernadero tipo parral mejorado (Tabla 3.3) nos indica una mayor respuesta antioxidante, posiblemente debido a que en este invernadero se presentaron los valores más elevados de temperatura, radiación solar y VPD en el interior del invernadero (Fig. 3.4).

Tabla 3.3. Contenido en H₂O₂, y actividades SOD, CAT y APX en los frutos de tomate cherry cultivados en los dos invernaderos experimentales durante tres periodos diferentes de producción.

	H ₂ O ₂ (μmol g ⁻¹ PF)		SOD (U mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)		CAT (μmol mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)		APX (nmol mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)	
	Parral	Multitúnel	Parral	Multitúnel	Parral	Multitúnel	Parral	Multitúnel
Muestras								
M1	2.90 c ¹	3.02 c	0.94 b	0.97 b	7.97 b	7.55 b	198.9 b	168.9 b
M2	3.35 b	3.51 b	1.04 b	1.06 b	15.8 b	8.83 b	172.0 b	161.7 b
M3	4.50 a	4.08 a	1.48 a	1.40 a	46.4 a	38.7 a	296.1 a	234.8 a
<i>P</i> -valor ²	***	***	***	***	***	***	**	**
LSD _{0.05}	0.38	0.39	0.17	0.12	10.6	2.64	70.4	59.3
Invernaderos								
Parral	3.58 a		1.18 a		23.4 a		222.3 a	
Multitúnel	3.54 a		1.15 a		18.4 b		188.5 b	
<i>P</i> -valor	NS		NS		*		**	
LSD _{0.05}	0.35		0.16		4.38		33.5	

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

3.3.4. Efectos de las condiciones ambientales sobre los solutos osmoprotectores

Existe una gran cantidad de compuestos que se acumulan en las células vegetales bajo situaciones de estrés ambiental, entre los que se incluyen aminoácidos, como la prolina, y azúcares (Koch, 1996; Claussen, 2005). Estos compuestos son denominados comúnmente solutos osmoprotectores o compatibles (Johnson *et al.*, 1968), ya que, aún siendo acumulados a elevadas concentraciones, no interfieren ni inhiben la actividad de otras enzimas celulares. Es más, los solutos osmoprotectores actúan como potentes protectores de enzimas y membranas frente al efecto mortal causado por la desestabilización iónica inducida bajo cualquier situación de estrés ambiental (Yancey *et al.*, 1982). De esta manera, la acumulación de solutos osmoprotectores podría definirse como una adaptación metabólica producida por un amplio número de especies vegetales tolerantes a un tipo de estrés determinado, sugiriendo la evolución convergente de todas ellas (Wyn Jones y Storey, 1981; Yancey *et al.*, 1982). La función atribuida por los científicos a la acumulación de estos compuestos en las células vegetales es diversa, y depende del tipo de estrés bajo el cual son acumulados.

Es bien conocido que la prolina se acumula en las plantas durante la adaptación a varios tipos de estrés ambiental como la sequía, salinidad, temperaturas extremas, excesiva intensidad de luz y deficiencia de nutrientes (Hare *et al.*, 1999; Claussen, 2005). La prolina es un aminoácido altamente soluble que se acumula a niveles osmóticamente significativos en todos los órganos vegetales. Adicionalmente a esta función como osmoprotector, la acumulación de prolina bajo situaciones de estrés ambiental puede servir para la obtención de poder reductor y como fuente de N (Blum y Ebercon, 1976; Madan *et al.*, 1995). Así, la degradación de prolina da lugar a la producción de glutamato, el cual actúa como fuente de N para la síntesis de otros aminoácidos. Además, también puede actuar como fuente de energía primaria para favorecer el crecimiento (Hong *et al.*, 1982). Por último, la acumulación de

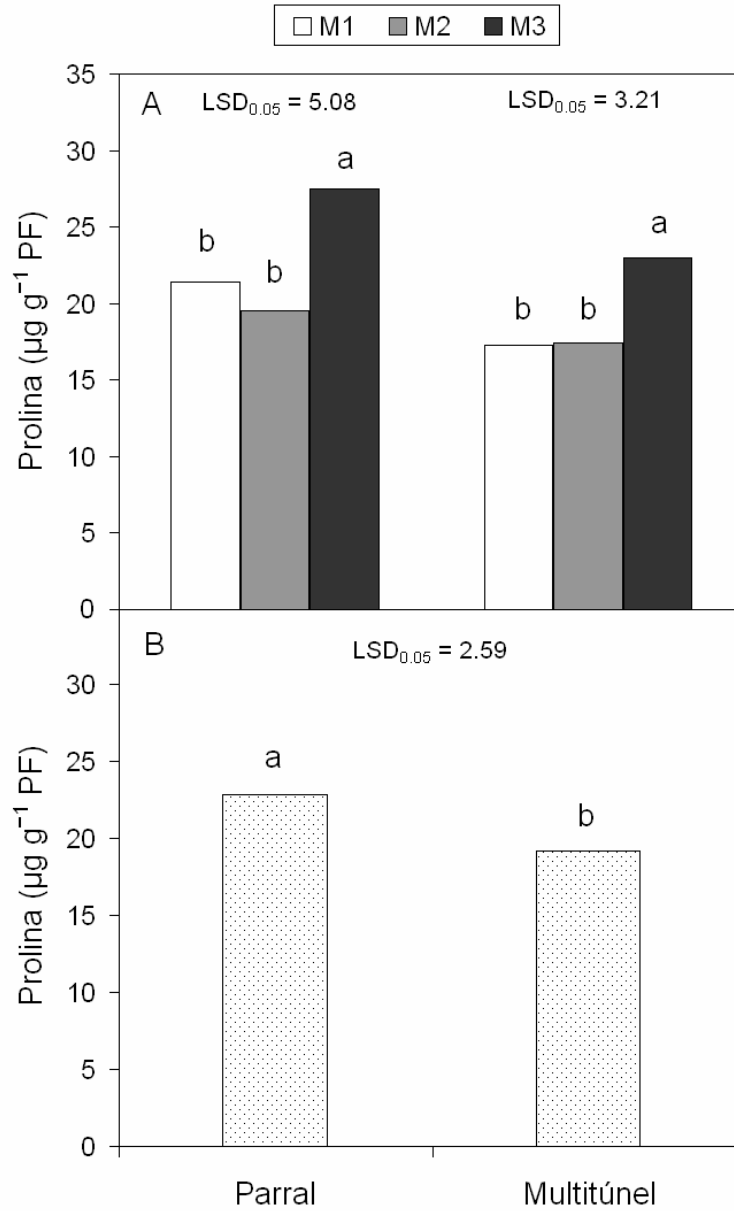


Figura 3.8. Contenido en prolina en los frutos de tomate cherry cultivados en los dos invernaderos experimentales durante tres periodos diferentes de producción. Los valores seguidos con las mismas letras en cada invernadero no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

prolina tiene la ventaja, sobre la acumulación de otros compuestos, de no interferir con las reacciones bioquímicas del metabolismo celular (Bohnert *et al.*, 1995) y de servir como agente protector de muchas enzimas y estructuras celulares muy importantes para el metabolismo vegetal (Schobert y Tschesche, 1978; Huang *et al.*, 2000).

El incremento en la radiación solar, DPV y temperatura al final del periodo de cosecha en nuestro experimento podría haber desencadenado una serie de mecanismos de defensa antioxidante frente a esta situación de estrés, que podrían incluir la acumulación de solutos osmoprotectores como la prolina. La Fig. 3.8.A muestra unos valores más elevados en el contenido de prolina en los frutos de tomate cherry recogidos en el tercer muestreo en ambos invernaderos, lo que nos vuelve a sugerir una situación de estrés ambiental en los tejidos vegetales (Claussen, 2005), y más específicamente bajo condiciones de estrés por calor y fuerte radiación (Georgieva *et al.*, 2003; Rivero *et al.*, 2004b). Además, el contenido en prolina fue más acusado en el invernadero parral mejorado durante todo el ciclo productivo (Fig. 3.8.B), coincidiendo con los valores más elevados de temperatura, radiación solar y VPD (Fig. 3.4). Por tanto, en base a estudios que demuestran que solutos osmoprotectores como la prolina son capaces de detoxificar ROS mediante la formación de un complejo estable con ellos, e inhibiendo así la peroxidación de lípidos (Hong *et al.*, 2000), la acumulación de prolina en los tomates del invernadero parral nos indicaría claramente la existencia de unas mayores condiciones de estrés.

Generalmente, el fruto de tomate acumula azúcares en forma de sacarosa o hexosas (glucosa y fructosa principalmente) dependiendo de las condiciones ambientales y de la fase de crecimiento de la planta (Davies y Hobson, 1981; Islam *et al.*, 1996). La sacarosa es el principal producto de la fotosíntesis en las plantas y la mayor forma en la que los carbohidratos se translocan desde las hojas hasta el resto de la planta, para abastecer de carbono y energía durante el crecimiento y el almacenaje (ap Rees, 1987). La sacarosa puede ser por sí misma una reserva importante en hojas, tallos, tubérculos y frutos, y puede también ayudar a proteger a las plantas de

estreses ambientales como el frío y la sequía (Lunn y Furbank, 1999). En los últimos años, se ha reconocido que la sacarosa también actúa como un compuesto señal, comunicando información entre diferentes partes de la planta en relación al ambiente externo (Koch, 1996). Los carbohidratos solubles, especialmente la sacarosa, lo cuáles normalmente contribuyen al ajuste osmótico, también se implican en el transporte de carbono a las regiones en crecimiento y, por tanto, están directamente involucrados en la productividad de los cultivos (Pérez-Alfocea y Larher, 1995). La Tabla 3.4 muestra que la concentración de sacarosa en los frutos disminuyó progresivamente a lo largo del ciclo de producción en ambos invernaderos, alcanzando los valores más bajos en el tercer muestreo (35 SDT), coincidiendo con las condiciones más elevadas de los parámetros ambientales estudiados (Fig. 3.4). El descenso en la concentración de sacarosa junto con el incremento en el contenido en

Tabla 3.4. Contenido en prolina y azúcares en los frutos de tomate cherry cultivados en los dos invernaderos experimentales durante tres periodos diferentes de producción.

Muestras	Hexosas (mg g⁻¹ PF)		Sacarosa (mg g⁻¹ PF)		Hexosas:Sacarosa	
	<u>Parral</u>	<u>Multitúnel</u>	<u>Parral</u>	<u>Multitúnel</u>	<u>Parral</u>	<u>Multitúnel</u>
M1	32.1 c	35.9 b	1.97 a	1.96 a	17.7 b	19.5 b
M2	37.6 b	37.8 b	1.46 b	1.30 b	33.1 b	33.0 ab
M3	44.6 a	47.6 a	0.82 c	1.14 c	72.7 a	49.8 a
<i>P</i> -valor ²	***	***	***	**	**	***
LSD _{0.05}	2.90	4.72	0.25	0.15	30.4	17.6
Invernaderos						
Parral	38.1 b		1.42 a		41.1 a	
Multitúnel	40.5 a		1.47 a		34.1 b	
<i>P</i> -valor	*		NS		**	
LSD _{0.05}	2.10		0.26		5.71	

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

hexosas y en el cociente hexosas:sacarosa (Tabla 3.4) indica claramente una degradación de sacarosa, que fue mucho más marcada en los frutos recogidos en el tercer muestreo, coincidiendo con las condiciones de estrés ambiental. Además, los tomates cultivados en el invernadero parral presentaron un menor contenido en hexosas y un mayor cociente hexosas:sacarosa que en el multitúnel, no mostrándose diferencias en cuanto al contenido en sacarosa (Tabla 3.4). Dado que la glucosa es el principal precursor del ascorbato y de ciertos pigmentos antioxidantes (como los carotenoides), y que la fructosa también interviene en la síntesis de antioxidantes (Carrari y Fernie, 2006), este incremento en la degradación de sacarosa puede contribuir a los mecanismos de defensa antioxidante del fruto. Por tanto, el aumento en la actividad sucrolítica durante el tercer muestreo, y más efusivamente en el invernadero parral, puede indicar la presencia de un estrés oxidativo y contribuir a los mecanismos de defensa antioxidante anteriormente descritos mediante el abastecimiento de precursores de compuestos antioxidantes ante la existencia de un estrés oxidativo generado por el incremento en la temperatura, radiación solar y DPV al final del periodo de producción del cultivo.

3.3.5. Conclusión

En nuestro experimento observamos cómo aunque los frutos de tomate cherry han desarrollado mecanismos antioxidantes, como son el aumento del contenido en ascorbato (Tabla 3.2), el incremento de las actividades SOD, CAT y APX (Tabla 3.3), y el aumento del contenido en prolina (Tabla 2) y degradación de sacarosa (Tabla 3.4), especialmente en el tercer muestreo y en el invernadero de baja tecnología. Sin embargo, la detoxificación de los ROS no es suficientemente efectiva ya que se produce peroxidación de lípidos bajo las condiciones de estrés ambiental. La toxicidad del H_2O_2 por sí sola es relativamente débil comparado con otros ROS, pero en presencia del anión superóxido, el H_2O_2 puede generar una gran cantidad de radicales hidroxilo reactivos a través de la reacción de Haber-Weiss catalizada por metales (Yamasaki *et al.*, 1997). Por tanto, y según nuestros resultados, el desarrollo de los mecanismos de respuesta antioxidante durante las condiciones de estrés

puede reducir el efecto negativo del H_2O_2 pero no puede evitar el efecto de otros ROS. Esto podría explicar el incremento de la peroxidación de lípidos y la reducción en la producción comercial principalmente en el invernadero parral. Así, bajo las condiciones de estrés ambiental (tercer muestreo) el incremento en el contenido en H_2O_2 no es muy elevado gracias al notable aumento en las actividades CAT y APX; no obstante, el estrés ambiental podría estar afectando a la actividad SOD ya que sólo incrementa un 40% su actividad, siendo ineficiente para poder detoxificar otros ROS más tóxicos como el anión superóxido.

En resumen, los frutos de tomate cherry sometidos a elevadas temperaturas, radiación solar y DPV (Fig. 3.4) sufrieron un incremento en la peroxidación de lípidos y, por tanto, de estrés oxidativo. Estas condiciones de estrés desencadenaron una respuesta antioxidante basada en un incremento en síntesis de ascorbato y en las enzimas de detoxificación de H_2O_2 (CAT y APX), una acumulación de prolina y un aumento en la actividad sucrolítica. Sin embargo, posiblemente este aumento limitado en la actividad SOD fue determinante en este proceso, ya que no fue suficiente para detoxificar otros ROS más tóxicos como el superóxido. Aunque más investigación al respecto es necesaria, este descubrimiento puede ser fundamental en la selección o desarrollo de plantas resistentes a este tipo de estrés. Finalmente, encontramos que en el invernadero parral mejorado (baja-tecnología), comparado con el invernadero multitúnel (alta-tecnología), se alcanzaron las mayores condiciones de estrés ambiental, definido por los valores más elevados de los indicadores de estrés estudiados y de las respuesta antioxidante, lo que explicaría la reducción de la producción comercial producida en este invernadero.

CAPÍTULO 4

CALIDAD NUTRICIONAL
EN FRUTOS DE TOMATE CHERRY CULTIVADOS
EN DOS INVERNADEROS MEDITERRÁNEOS EXPERIMENTALES

4.1. INTRODUCCIÓN.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta hortícola anual con una gran distribución mundial y un valor económico elevado, que gracias a su gran contenido en compuestos antioxidantes presenta una serie de efectos beneficiosos para la salud a través de su consumo (Bilton *et al.*, 2001). Introducido desde América del Sur a principios del siglo XVIII, el tomate (tanto fresco como procesado) es un componente esencial en la dieta mediterránea tradicional, una dieta comúnmente conocida por ser beneficiosa para la salud, especialmente en relación al desarrollo de enfermedades degenerativas crónicas (Bilton *et al.*, 2001). Muchos estudios epidemiológicos han relacionado al efecto beneficioso del consumo de tomate con la prevención de algunas de las principales enfermedades crónicas, como son algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (La Vecchia, 1998; Rao y Agarwall, 2000). Los beneficios protectores de los compuestos antioxidantes son, en parte, debidos a su capacidad de detoxificar los radicales libres y, por tanto, prevenir los cambios oxidativos anormales producidos en el cuerpo humano. Así, los tomates son beneficiosos para la salud humana gracias a su elevado contenido en fitonutrientes como licopeno, β -caroteno, compuestos fenólicos, ácido ascórbico y otros nutrientes esenciales (García-Closas *et al.*, 2004).

Uno de los fitonutrientes más característicos del tomate es el licopeno, un carotenoide con una gran capacidad de eliminar ROS y que representa más del 80% de los carotenoides totales en el fruto de tomate (Rao *et al.*, 1998). El licopeno es también responsable del enrojecimiento del tomate, debido a la diferenciación de los cloroplastos a cromoplastos, por eso este carotenoide es muy importante en la calidad nutricional final y comercial de este producto hortícola (Dumas *et al.*, 2003). Existen muchos estudios donde se observa una fuerte relación entre la calidad nutricional del tomate y su contenido en licopeno (Gautier *et al.*, 2005; Raffo *et al.*, 2006; Toor *et al.*, 2006), ya que se ha reconocido como una molécula que suprime la proliferación celular en humanos e interfiere con el crecimiento de las células cancerígenas, previniendo así la incidencia de cáncer de próstata (Giovanucci *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 1995).

Otro carotenoide presente en los frutos de tomate es el β -caroteno, un fotoprotector que actúa en la fotosíntesis como pigmento recolector de luz, aunque de menor importancia que el licopeno ya que constituye sólo el 7% del contenido total de carotenoides del fruto (Bilton *et al.*, 2001). El β -caroteno, también conocido como pro-vitamina A, es un poderoso antioxidante con una serie de beneficios para la salud humana: ayuda al sistema inmune y destruye las células cancerígenas (Nkondjock y Ghadirian, 2004); reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares, síndrome de fatiga crónica, soriasis, cáncer de piel y lupus (Hyson, 2002); y es necesario en la prevención de la ceguera y las cataratas, y en la recepción de luz por el ojo humano (Bartley y Scolnick, 1995).

Junto a los carotenoides, los compuestos fenólicos o polifenoles representan otra de las dos grandes clases de fitonutrientes encontrados en frutos y vegetales de la dieta mediterránea. Los polifenoles son unos componentes vegetales ubicuos que derivan principalmente de la fenilalanina a través del metabolismo fenilpropanoide (Dixon y Paiva, 1995). Además, estos compuestos confieren un papel importante en la respuesta a condiciones de estrés. El anillo aromático hidroxilado característico de los compuestos fenólicos es un excelente agente reductor, permitiendo a los compuestos presentes en la planta donar un radical hidrogeno a los radicales libres reactivos en los ambientes biológicos. El anillo aromático es capaz de estabilizar el electrón desapareado por resonancia y cesar la propagación de los radicales o especies dañinas. Así, los compuestos fenólicos pueden actuar en las plantas como fitoalexinas, frente a la herbivoría, como atrayente de polinizadores, contribuyendo a la pigmentación vegetal, como antioxidantes y protegiendo frente a la luz UV (Duthie *et al.*, 2000; Naczki y Shahidi, 2006). El interés de los compuestos fenólicos como antioxidantes se centra principalmente en los flavonoides. Las funciones de los flavonoides en las plantas no están todavía muy claras, aunque se les atribuyen funciones en los mecanismos de defensa frente a la herbivoría, estrés por patógenos y radiación UV-B (Harborne y Williams, 2000). Por otro lado, existen estudios epidemiológicos que sugieren un beneficio por el consumo humano de frutas y verduras ricas en flavonoides, ya que protegen frente a las enfermedades cardiovasculares, cáncer u otras enfermedades relacionadas con la edad como

la demencia (Commenges *et al.*, 2000; Knekt *et al.*, 2002). Finalmente, existen flavonoides, como las antocianinas, que son también importantes como antioxidantes, ya que protegen a las plantas frente al estrés oxidativo, actuando como un fotoprotector que absorbe la luz naranja-verde del espectro visible, previniendo así la foto-oxidación de las clorofilas (Merzlyak y Chivkunova, 2000). Además de la protección frente a la luz UV, a las antocianinas también se le han atribuido funciones como antioxidantes y antiherbivoría (Smillie y Hetherington, 1999). Aparte de sus funciones fisiológicas en las plantas, las antocianinas se consideran componentes importantes en la nutrición humana, ya que producen un aumento en la capacidad antioxidante, transportándose a zonas con una actividad metabólica elevada donde producen una reducción en la permeabilidad y fragilidad de los capilares, inhibiendo la agregación de las plaquetas y toda estimulación inmune (Stintzing y Carle, 2004).

Sin embargo, el antioxidante más efectivo de los diferentes productos vegetales es el ascorbato o vitamina C (Smirnoff, 1996). Este compuesto tiene un papel fisiológico muy importante ya que, además de estar envuelto directamente en la eliminación de ROS y en la regeneración de la vitamina E en las plantas (Asada, 1994), participa en el metabolismo celular y en el control del crecimiento (Navas y Gómez-Díaz, 1995), en la división celular (Kerk y Feldman, 1995), en la expansión de la pared celular (Takahama y Oniki, 1994) y en la organogénesis (Joy *et al.*, 1988). Como un antioxidante, el ascorbato elimina directamente los ROS a través de una vía no enzimática y reduce el peróxido de hidrógeno a agua a través de la reacción APX (Foyer y Noctor, 2005). No obstante, el ascorbato puede ser sintetizado por las plantas y por la gran mayoría de los mamíferos, pero no por los seres humanos (Buettner y Jurkiewicz, 1996), donde es fundamental en el mantenimiento de un sistema inmune saludable, ya que reduce la severidad de algunas enfermedades como el resfriado o la gripe mediante la prevención de las infecciones virales secundarias o bacterianas, protegiendo frente al daño producido por los ROS (Larsen, 1997), y en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Eichholzer *et al.*, 2001).

El clima mediterráneo se caracteriza por un aumento en la radiación solar, temperatura y déficit de presión de vapor (DPV) durante los meses de verano. Estas variables ambientales pueden limitar severamente tanto la productividad como la calidad de un cultivo (Adams *et al.*, 2001). En los invernaderos, estas condiciones ambientales adversas pueden generar ROS en los frutos de tomate cherry (Dumas *et al.*, 2003), que atacan a todo tipo de biomoléculas produciendo el deterioro de las membranas, peroxidación de los lípidos y mutaciones en el ADN, lo cuál puede desencadenar una serie de disfunciones metabólicas y estructurales irreparables y finalmente la muerte celular. Todos estos cambios oxidativos han llegado a ser caracterizados colectivamente como síntomas del síndrome denominado “estrés oxidativo” (Halliwell y Guteridge, 1989; Foyer y Noctor, 2005). Por tanto, el estrés oxidativo es uno de los procesos fisiológicos más importantes que pueden alterar o reducir de manera significativa la producción, la calidad nutricional y organoléptica, y la actividad antioxidante de los diferentes productos vegetales destinados al consumo humano. Sin embargo, el entendimiento de la influencia de los factores ambientales y sus interacciones con las prácticas agronómicas sobre la calidad de los frutos de tomate es todavía deficiente, aunque en general sí se han observado algunas relaciones. Así, se sabe que una exposición a temperaturas elevadas inhibe la síntesis de licopeno y provoca la degradación de β -caroteno debido a la presencia de los ROS (Dumas *et al.*, 2003). Este incremento en las temperaturas durante el verano suele estar acompañado por una intensa radiación solar, la cuál induce un proceso de sobrecalentamiento en el fruto que bloquea la acumulación de licopeno, formando zonas decoloradas comúnmente conocidas como “mancha solar” (. Esta fisiopatía aparece en los frutos maduros de tomate cherry formando un anillo o manchas amarillo-anaranjadas alrededor de la zona de abscisión del fruto y que resultan de la síntesis reducida de licopeno o de un aumento en la oxidación de este compuesto a β -caroteno (Adegoroye y Jolliffe, 1976), causando pérdidas dramáticas a los productores y a los consumidores (Adams *et al.*, 2001).



Imagen 4.1. Comparación de frutos de tomate cherry (cv. Naomi) sanos (izquierda) y con mancha solar (derecha).

En relación a los compuestos fenólicos, aunque hay poca información al respecto, se ha descubierto que las plantas de tomate cherry crecidas en invernadero bajo condiciones de intensa luz acumularon aproximadamente el doble de su contenido normal en fenoles solubles (rutin y ácido clorogénico) que plantas crecidas bajo una baja intensidad de luz (Wilkins *et al.*, 1996). Torres *et al.* (2006) demostraron que, al igual que en las hojas, los flavonoides se inducen rápidamente en el exocarpo de los frutos de tomate sometidos a una radiación solar elevada como una respuesta fisiológica de aclimatación.

Por otro lado, existe una gran controversia en cuanto al contenido en ascorbato bajo condiciones de estrés ambiental, ya que se han realizado estudios donde se observa un incremento en el contenido en ascorbato y en la capacidad antioxidante en tomates expuestos a temperaturas elevadas y fuerte radiación solar, produciendo una mejor aclimatación y/o tolerancia al estrés oxidativo (Davey *et al.*, 2000; Dumas *et al.*, 2003), mientras que otros autores han obtenido una reducción en el contenido de ascorbato en tomates crecidos bajo condiciones similares (Adegoye y Jolliffe, 1976; Hamazu *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 2006). Finalmente, y a pesar de los pocos estudios realizados al respecto, parece ser que el sabor de los frutos de tomate también está afectado por las condiciones de estrés producidas durante el verano. Así, Winsor y Adams (1976) en su estudio ya demostraron un aumento en el

contenido en azúcares durante los meses de verano en los invernaderos mediterráneos, lo que provocó un incremento en la calidad de los tomates.

Además de la calidad nutricional, caracterizada por el contenido en fitonutrientes con propiedades antioxidantes relacionadas con la salud humana, la calidad de los frutos de tomate también está estrechamente relacionada con su calidad organoléptica, definida por una serie de parámetros físico-químicos que hacen al producto satisfactorio para los consumidores (Anza *et al.*, 2006). El parámetro más importante en la calidad organoléptica de los frutos de tomate es el sabor, producido principalmente por una combinación de azúcares y ácidos orgánicos, que determinan los sabores dulce y ácido respectivamente (Salles *et al.*, 2003). En el sabor dulce, la fructosa tiene una mayor importancia que la glucosa, y en la acidez es el ácido cítrico el que destaca en relación al ácido málico. Sin embargo, según los estudios realizados hasta el momento parece que el dulzor del fruto de tomate no sólo está determinado por el contenido en azúcares, sino que existen una serie de efectos sinérgicos con los ácidos orgánicos, como el ácido cítrico y el ácido málico, responsables del sabor ácido (Jones, 1999). Así, la concentración de ácido cítrico parece aumentar la importancia de la glucosa en el sabor dulce en comparación con la fructosa (De Bryun *et al.*, 1971), y se ha demostrado que este ácido disminuye el dulzor cuando la concentración de azúcares en el tomate es baja y lo incrementaba cuando la concentración de azúcar es elevada (Stevens *et al.*, 1977). Aunque el ácido málico confiere un sabor más ácido que el ácido cítrico (De Bryun *et al.*, 1971), su influencia es menor ya que el ácido cítrico se encuentra en una mayor concentración. También se ha comprobado que, a bajas concentraciones de ácido cítrico y de glucosa, la fructosa reduce la acidez (Stevens *et al.*, 1977). Por tanto, para un mejor sabor del fruto de tomate es necesaria una concentración elevada en azúcar junto con un contenido relativamente elevado en ácidos. Además, una concentración baja en azúcares y alta en ácidos produce un sabor agrio en los tomates, mientras que un contenido elevado en azúcares y bajo en ácidos produce un sabor dulce o suave, y finalmente un contenido bajo en ambos produce un sabor insípido (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999).

En el capítulo anterior, observamos cómo bajo condiciones de temperatura, radiación solar y DPV elevadas se produjo un aumento en la peroxidación de lípidos y, por tanto, de estrés oxidativo, lo cuál desencadenó una respuesta antioxidante basada en el aumento en la síntesis de ascorbato, detoxificación de H_2O_2 y acumulación de prolina. Además, en este estudio pudimos observar cómo en el invernadero parral mejorado (baja tecnología), en comparación al invernadero multitúnel (alta tecnología), se alcanzaron las mayores condiciones de estrés ambiental definido por los elevados valores de los indicadores de estrés y de respuesta antioxidante obtenidos. Finalmente, es importante destacar que aunque no se observaron diferencias significativas en los valores de producción entre ambos invernaderos, sí se produjo una reducción significativa en la producción comercial al final del ciclo productivo en el invernadero parral. Por tanto, el objetivo de este estudio fue demostrar cómo diferentes factores ambientales (temperatura, radiación solar y DPV) influyeron sobre la calidad nutricional y el sabor en frutos de tomate cherry cultivados en dos tipos de invernaderos mediterráneos experimentales: de baja tecnología (parral mejorado) y de alta tecnología (multitúnel).

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.2.1. Diseño experimental y condiciones de crecimiento.

Toda información relacionada con la descripción del área de ensayo y de los invernaderos experimentales, la agronomía del cultivo, la caracterización microclimática y los muestreos de los frutos se encuentra bien detallada en el apartado Material y Métodos del capítulo anterior (apartado 3.2).

4.2.2. Análisis vegetal.

4.2.2.1. Carotenoides: licopeno y β -caroteno.

El licopeno y el β -caroteno se extrajeron en una mezcla de acetona-*n*-hexano (4:6) y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min a 4°C. Posteriormente, la densidad óptica de los sobrenadantes se midió espectrofotométricamente a unas longitudes de onda de 663, 645, 505 y 453 nm, usando la mezcla de acetona-*n*-hexano (4:6) como blanco. Las concentraciones de licopeno y β -caroteno se cuantificaron usando las ecuaciones propuestas por Nagata y Yamashita (1992), de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} [\text{licopeno}] (\mu\text{g mL}^{-1}) &= -0.0458 A_{663} + 0.204 A_{645} + 0.372 A_{505} - 0.0806 A_{453} \\ [\beta\text{-caroteno}] (\mu\text{g mL}^{-1}) &= 0.216 A_{663} - 1.220 A_{645} - 0.304 A_{505} + 0.452 A_{453} \end{aligned}$$

donde A_{663} , A_{645} , A_{505} y A_{453} , son respectivamente las absorbancias obtenidas a las longitudes de onda de 663, 645, 505 y 453 nm. Estas ecuaciones nos permitieron la determinación simultánea de licopeno y β -caroteno en presencia de clorofilas.

4.2.2.2. Concentración de fenoles totales y flavonoides.

Los fenoles totales y los flavonoides contenidos en los frutos de tomate cherry fueron extraídos con metanol siguiendo el método propuesto por Ruiz *et*

al. (1998) y cuantificándose según los métodos de Singleton y Rossi (1965) y Johnson y Schaal (1957), optimizado para nuestras condiciones. Una cantidad de 1.5 g de tomate fue homogenizado con 5 mL de metanol y lavado con 5 mL de cloroformo y 2.5 mL de una solución de NaCl al 1%. El sobrenadante resultante de la centrifugación a 5000 rpm durante 10 min fue filtrado, obteniéndose las siguientes fases:

- Fase metanólica: que contiene ácidos fenólicos, azúcares solubles y compuestos de bajo peso molecular.
- Interfase: formada por proteínas precipitadas por el NaCl.
- Fase clorofórmica: constituida por lípidos disueltos.

La solución metanólica fue utilizada para la cuantificación de la concentración de fenoles totales y flavonoides.

Los fenoles totales fueron determinados espectrofotométricamente gracias al complejo de color que forman estos compuestos con el reactivo Folin-Ciocalteu, siguiendo el método propuesto por Singleton y Rossi (1965). Para ello, la mezcla de reacción consistió en: 1.5 mL de Na₂CO₃ al 2%, 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 50%, 2.75 mL de H₂O desionizada y 0.5 mL del extracto enzimático. Transcurridos 60 min se procedió a la determinación de los fenoles totales frente a una curva patrón de ácido caféico y a una absorbancia de 725 nm. Los resultados fueron expresados como $\mu\text{g ácido caféico g}^{-1}$ PF.

El contenido en flavonoides fue cuantificado mediante el método colorimétrico propuesto por Kim *et al.* (2003). Para la determinación, se tomaron 0.5 mL de la fase metanólica del extracto a la que se le añadió 2 mL de H₂O y 0.15 mL de NaNO₂ al 5%. A continuación se incubaron las muestras durante 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad, y transcurrido este tiempo se añadió 0.15 mL de una solución de AlCl₃·6H₂O al 10% y 1 mL de una solución de 1 M NaOH. La mezcla de reacción fue bien agitada e incubada a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 min. La absorbancia se midió

a 415 nm y el contenido de flavonoides fue calculado usando una curva patrón de rutin. Los resultados fueron expresados como $\mu\text{g rutin g}^{-1}$ PF.

4.2.2.3. Contenido en antocianinas.

Las antocianinas fueron extraídas siguiendo el procedimiento descrito por Ticconi *et al.* (2001). Para ello, se homogenizaron 4 g de tomate en 10 mL de una solución compuesta por propanol-HCl-H₂O (18:1:81). Posteriormente, las muestras fueron hervidas en un baño de agua durante 3 min, dejando las muestras en oscuridad y a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado este tiempo, el sobrenadante se centrifugó a 6500 rpm durante 40 minutos a 4°C, y después del centrifugado la absorbancia del sobrenadante se midió a 535 y 650 nm. La absorbancia correspondiente a las antocianinas se calculó según la fórmula descrita por Lange *et al.* (1971): $A = A_{535} - A_{650}$.

4.2.2.4. Ascorbato total.

Véase el apartado 3.2.7.2.

4.2.2.5. Ensayos de capacidad antioxidante: “Ferric Reducing Ability of Plasma” (FRAP) y “Trolox Equivalent Antioxidant Capacity” (TEAC).

La extracción vegetal para los ensayos FRAP y TEAC se realizó según el método descrito por Wold *et al.* (2004), con algunas modificaciones, donde 1 g de tomate cherry se homogenizó en 5 ml de metanol, y posteriormente se centrifugó a 10200 rpm durante 2 minutos.

El ensayo FRAP se llevó a cabo mediante el reactivo FRAP, compuesto por 1 mM 2,4,6-tripiridil-2-triazina (TPTZ) y 20 mM FeCl₃ en 0.25 M acetato sódico (pH 3.6). Una alícuota de 100 μL del extracto obtenido de la homogenización de 1 g de tomate en 10 mL de metanol fue añadido a 2 ml de reactivo FRAP. Posteriormente la mezcla fue incubada a temperatura ambiente (20°C) durante 5 min. La absorbancia fue medida a 593 nm frente a una curva patrón de 25–1600 $\mu\text{M Fe}^{3+}$ preparada usando una solución madre 25 mM de

sulfato ferroso (Benzie y Strain, 1996). Los resultados fueron expresados como $\mu\text{mol FeSO}_4 \text{g}^{-1}$ PF.

El ensayo TEAC se realizó siguiendo el método de Re *et al.* (1999) y Cai *et al.* (2004). En primer lugar, se mezcló 7 mM de 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) con 2.45 mM de persulfato potásico para producir el catión $\text{ABTS}^{\bullet+}$, para lo cual la mezcla resultante fue incubada durante 16 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ resultante se diluyó en metanol y se ajustó su absorbancia (usando metanol como blanco) hasta que registró un valor de 0.7 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm. Una alícuota de 100 μL de extracto se mezcló vigorosamente con 3.9 mL de solución de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ diluido, y se dejó en oscuridad a temperatura ambiente durante 6 minutos e inmediatamente después se registró la absorbancia a 734 nm. Las muestras fueron enfrentadas a una curva patrón de 0-15 μM de trolox que siguió el mismo procedimiento que las muestras vegetales. Los resultados fueron expresados como $\mu\text{mol equivalentes trolox g}^{-1}$ PF.

4.2.2.5. Ensayos de capacidad antioxidante: efecto detoxificador de radicales libres 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) y Poder Reductor.

Para la determinación de los ensayos DPPH y Poder Reductor, la extracción se realizó homogenizando 1 g de tomate cherry en 5 mL de metanol al 80% y centrifugando posteriormente a 6000 rpm durante 10 min (Zhang y Hamazu, 2004).

El ensayo DPPH se realizó según el método descrito por Hsu *et al.* (2003), con algunas modificaciones. Para ello, se mezclaron meticulosamente una alícuota de 0.5 mL del extracto metanólico de tomate y 2.5 mL de la solución metanólica fría que contenía 0.1 M DPPH, manteniéndose después durante 60 min en oscuridad a 4°C. La absorbancia de la mezcla de reacción fue medida a una longitud de onda de 517 nm en un espectrofotómetro. Como blanco se reemplazó el extracto por 0.5 mL de metanol al 80%. El efecto

detoxificador de radicales libres DPPH se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Efecto detoxificador DPPH (\%)} = [1 - (A_{517}\text{muestra}/A_{517}\text{blanco})] \times 100.$$

El ensayo de Poder Reductor de los frutos de tomate cherry fue medido de acuerdo con el método descrito por Hsu *et al.* (2003). A 1 mL de extracto de tomate se le añadió 0.5 mL de buffer fosfato (0.2 M, pH 6.6) y 2.5 mL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1% v/w) y la mezcla fue incubada durante 20 min a 50°C. Posteriormente los tubos fueron enfriados inmediatamente sumergiéndolos en hielo y entonces se les añadió 0.5 mL de ácido tricloroacético al 10%. A continuación, fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 min. Finalmente, se tomo 1 mL del sobrenadante y se mezcló con 1 mL de H_2O y 0.1 mL de FeCl_3 (0.1%), la mezcla se incubó durante 10 min. y se midió la absorbancia a 700 nm en el espectrofotómetro. La cantidad de poder reductor se da directamente en absorbancia.

4.2.2.6. Determinación de azúcares, ácidos orgánicos, acidez valorable e índices del sabor.

Los contenidos en sacarosa, D-glucosa, D-fructosa, ácido cítrico y ácido málico se determinaron mediante el uso de ensayos enzimáticos comerciales (R-Biopharm, Francia), en los cuáles se midió la formación u oxidación de NADH o NADPH a 340 nm, de acuerdo a lo descrito en el protocolo de cada ensayo. Los resultados fueron expresados como mg g^{-1} PF.

La acidez valorable se determinó mediante volumetría ácido-base del filtrado con $\text{Na}(\text{OH})$ 0.1 M hasta la persistencia de un pH 8.2, medido con un pH-metro. La acidez valorable se expresa en relación al ácido orgánico mayoritario en el fruto de tomate que suele ser el ácido cítrico, en % ácido cítrico g^{-1} PF (Jarret *et al.*, 1984).

El índice de dulzor de los frutos de tomate cherry, una estimación de la percepción total del dulzor, se calculó en base a la cantidad y las propiedades

de dulzor de los carbohidratos individuales (Keutgen y Pawelzik, 2008). La contribución de cada carbohidrato fue calculada en base al hecho de que la fructosa y la sacarosa son respectivamente 2.30 y 1.35 veces más dulces que la glucosa y, por lo tanto, el índice de dulzor se expresó usando la concentración molar de cada azúcar la siguiente manera:

$$\text{Índice de dulzor} = (1.00 [\text{glucosa}]) + (2.30 [\text{fructosa}]) + (1.35 [\text{sacarosa}]).$$

El cociente azúcares/ácidos se calculó considerando la concentración molar de cada compuesto individual. Así, el valor de los azúcares corresponde a la suma del contenido en glucosa, fructosa y sacarosa, y el valor de los ácidos corresponde a la suma del contenido en ácido cítrico y ácido málico (Mencarely y Salveit, 1988).

4.2.2.8. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias se compararon mediante el test de rango múltiple de Duncan (DMRT; $P < 0.05$). Los valores obtenidos de cada parámetro corresponden a la media de los tres años de estudio (2004, 2005 y 2006). Además, para determinar si el tipo de invernadero experimental y el tiempo de muestreo influyó significativamente en los resultados, se utilizó una ANOVA de dos vías y las medias fueron comparadas mediante el test de diferencias significativas mínimas de Fisher (LSD). Los niveles de significación se han representado mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.3.1. Efecto de las condiciones ambientales sobre el contenido de algunos fitonutrientes y la capacidad antioxidante.

Cada vez existen un mayor número de evidencias científicas que señalan los efectos aditivos y sinérgicos que los compuestos antioxidantes procedentes de frutas y verduras pueden tener sobre la salud humana, ya que pueden disminuir el riesgo de padecer numerosas patologías relacionadas con el estrés oxidativo. Entre los fitonutrientes de mayor actividad antioxidante encontramos a los carotenoides, que son pigmentos vegetales que contribuyen a la defensa antioxidante frente a la modificación oxidativa de los lípidos de baja densidad (LDL) (Oshima *et al.*, 1996), siendo el licopeno el más eficiente antioxidante de los carotenoides ya que actúa eliminando el oxígeno singlete y los radicales peroxilo (Sies y Stahl, 1998). Así, gracias a su gran capacidad antioxidante, carotenoides como el licopeno y el β -caroteno son esenciales para evaluar la calidad nutricional del fruto de tomate (Gautier *et al.*, 2005; Raffo *et al.*, 2006; Toor *et al.*, 2006). En nuestro experimento, en ambos invernaderos se produjo una disminución significativa en el contenido de licopeno durante el tercer muestreo (35 SDT; Tabla 4.1), coincidiendo con las condiciones de estrés oxidativo producido por los valores más elevados de temperatura, radiación solar y DPV (Fig. 3.4; ver apartado 3.3.1). Sin embargo, el contenido en β -caroteno manifestó un comportamiento diferente en los dos invernaderos (Tabla 4.1), ya que en el parral no se mostraron diferencias significativas a lo largo del periodo productivo, y en el multitúnel sí se produjo un incremento al final de este periodo. En cambio, no se produjeron diferencias significativas en cuanto al contenido de licopeno y β -caroteno entre los dos invernaderos (Tabla 4.1). Según varios estudios realizados, un incremento de la temperatura por encima de 30-35°C y una fuerte radiación solar mostraron un efecto inhibitor sobre la síntesis de licopeno o estimulador de su oxidación a β -caroteno (Dumas *et al.*, 2003), observándose también un aumento en la degradación de β -caroteno a partir de 35-40°C (Gautier *et al.*, 2005). Además, recientemente Gautier *et al.* (2008) han mostrado que en tomates sometidos a

una temperatura de 32°C se inhibía la síntesis de licopeno pero no la de β -caroteno, mientras que un incremento en la radiación sobre el fruto no inhibía la síntesis de carotenos por sí misma sino que la promovía. Ellos concluyen que esta reducción de los carotenos podría ser debida a una inhibición del gen de la fitoeno sintasa, el cuál juega un papel clave en la regulación de la síntesis de carotenos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio, ya que la disminución en el contenido en licopeno en el invernadero multitúnel puede ser debida a la oxidación de este compuesto a β -caroteno, lo que incrementaría su acumulación de este invernadero durante el tercer muestreo. Algunos autores (Leonardo *et al.*, 2000; Dorais *et al.*, 2001) han encontrado que los frutos de tomate cultivados en invernadero presentaban una coloración más intensa cuando las plantas crecían bajo un elevado DPV, lo que sugería un mayor contenido en licopeno posiblemente debido a un estado hídrico vegetal sub-óptimo. Sin embargo, estos datos no coinciden con los obtenidos en nuestro experimento, donde el incremento en la radiación solar y en la temperatura parece ser más influyente sobre el contenido en carotenoides. Por tanto, debido a las mayores condiciones de estrés a las que están sometidos los tomates cherry del invernadero parral en el tercer muestreo, además del aumento en la oxidación de licopeno a β -caroteno también se podría haber producido un aumento en la degradación de β -caroteno (Dumas *et al.*, 2003), lo cuál explicaría la ausencia de un aumento significativo de este pigmento en el tercer muestreo (Tabla 4.1).

En cuanto a los compuestos fenólicos, éstos son un extenso grupo de fitonutrientes con un amplio rango de estructuras químicas. Un aspecto importante es que estos compuestos pueden formar radicales estables capaces de modificar los procesos de oxidación mediados por radicales libres. Pueden actuar como quelantes de metales e inhibidores de enzimas como la xantina oxidasa, por lo que evitan la formación enzimática y no enzimática de ROS. Al ser buenos donadores de hidrógeno pueden impedir la reacción de propagación de los radicales generados en macromoléculas, rompiendo el ciclo de generación de nuevos radicales. Además, a algunos se les ha atribuido un posible papel anticarcinogénico ya que son capaces de bloquear o inhibir enzimas que son potenciales activadoras de precarcinógenos, incluso pueden

Tabla 4.1. Contenido en carotenoides (licopeno y β -caroteno) y compuestos fenólicos (fenoles totales, flavonoides y antocianinas) en los frutos de tomate cherry cultivados en los dos invernaderos experimentales durante tres periodos diferentes de producción.

Muestras	Licopeno ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)		β-caroteno ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)		Fenoles totales ($\mu\text{g ácido cafeico g}^{-1}$ PF)		Flavonoides ($\mu\text{g rutin g}^{-1}$ PF)		Antocianinas (abs a 535 nm g^{-1} PF)	
	<u>Parral</u>	<u>Multitúnel</u>	<u>Parral</u>	<u>Multitúnel</u>	<u>Parral</u>	<u>Multitúnel</u>	<u>Parral</u>	<u>Multitúnel</u>	<u>Parral</u>	<u>Multitúnel</u>
M1	6.19 a ¹	6.00 a	1.30 a	1.30 b	361.5 c	317.6 c	135.3 c	121.9 c	0.014 b	0.014 a
M2	6.30 a	6.09 a	1.35 a	1.38 b	433.4 b	408.1 b	174.9 b	182.6 b	0.016 b	0.015 a
M3	4.48 b	4.43 b	1.49 a	1.67 a	593.5 a	547.6 a	278.6 a	221.2 a	0.020 a	0.016 a
<i>P</i> -valor ²	**	**	NS	**	***	***	***	***	***	NS
LSD _{0.05}	1.26	1.37	0.28	0.21	52.2	66.9	26.2	26.7	0.002	0.002
Invernaderos										
Parral	5.66 a		1.38 a		462.8 a		196.3 a		0.017 a	
Multitúnel	5.51 a		1.45 a		424.4 b		175.2 b		0.015 b	
<i>P</i> -valor	NS		NS		*		*		*	
LSD _{0.05}	0.73		0.14		33.2		16.5		0.001	

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

inhibir la proliferación celular actuando sobre la tirosina kinasa (Parr y Bolwell, 2000). En relación a los compuestos fenólicos, aunque el control genético representa el principal factor determinante en su acumulación en productos vegetales, los factores ambientales también pueden tener un efecto significativo sobre ellos (Dumas *et al.*, 2003). Dentro de los compuestos fenólicos existe un grupo de compuestos de gran importancia denominados flavonoides, una familia que muestra multitud de actividades biológicas como antialérgenos, antitumorales, antivirales y antioxidantes. Generalmente, los flavonoides poseen un gran número de grupos hidroxilo, además de abundantes ortosustituciones con grupos metoxi o alquil que incrementan la estabilidad de los radicales libres y aumentan su potencial antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1995). Dentro de los flavonoides se encuentran las antocianinas, consideradas como uno de los grupos más importantes de pigmentos hidrosolubles en plantas (Wong, 1989). El interés actual en las propiedades biológicas de las antocianinas se debe tanto a su función antioxidante como al efecto potenciador sobre algunos compuestos como el ácido ascórbico (García-Alonso *et al.*, 2004).

En nuestro experimento, tanto el contenido en fenoles totales como en flavonoides en los frutos de tomate cherry incrementaron progresivamente a lo largo del ciclo productivo en ambos invernaderos (Tabla 4.1), alcanzando los valores más elevados en el tercer muestreo (35 SDT) y coincidiendo con las condiciones de estrés ambiental. Por el contrario, el contenido en antocianinas no varió durante todo el periodo de producción en el invernadero multitúnel, mostrándose un incremento significativo en el tercer muestreo en el invernadero parral mejorado (Tabla 4.1). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Wilkens *et al.* (1996), que mostraron un contenido en fenoles solubles dos veces superior en plantas de tomate cherry expuestas a una radiación solar elevada en comparación con plantas sometidas a una baja radiación solar. Por otro lado, Rivero *et al.* (2001) también mostraron una acumulación de fenoles totales en plantas de tomate sometidas a estrés térmico (35°C). Aunque existe muy poca información en relación al contenido en compuestos fenólicos en frutos de tomate sometidos a este tipo de estrés, Torres *et al.* (2006) determinaron que, al igual que en hojas, los flavonoides se

inducían rápidamente en el exocarpo de tomates expuestos a una radiación solar elevada como un mecanismo de respuesta fisiológica, ya que los flavonoides son capaces de absorber la luz y reducir la formación de mancha solar y de daño oxidativo. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos recientemente por Gautier *et al.* (2008), quienes mostraron un incremento en los contenidos de rutin y ácido cafeico en frutos de tomate cherry cuando la temperatura aumentaba de 27 a 32°C. Las antocianinas son otro grupo de pigmentos vegetales que actúan como antioxidantes y protegen frente a diferentes tipos de estrés ambiental (Merzlyak y Chivkunova, 2000), y que ha sido muy poco estudiado en frutos de tomate. En contradicción a nuestros resultados, existen estudios en frutos de fresa que muestran una reducción progresiva en el contenido de antocianinas a temperaturas de 30 a 45°C producido por un daño oxidativo (Pan *et al.*, 2004). Por otro lado, al comparar los dos invernaderos, observamos cómo el contenido en fenoles totales, flavonoides y antocianinas fue mayor en los tomates cherry del invernadero parral mejorado durante todo el ciclo productivo del cultivo (Tabla 4.1). Por tanto, y según nuestros resultados, podemos definir a estas condiciones de estrés provocadas por las elevadas temperaturas, radiación solar y DPV como las principales responsables del incremento en fenoles totales, flavonoides y antocianinas (este último en el caso del invernadero parral), producido como un posible mecanismo de respuesta fisiológica de aclimatación a este tipo de estrés.

En plantas superiores, el ascorbato tiene una gran importancia, ya que está directamente involucrado en la eliminación de ROS mediante vías no enzimáticas o través del ciclo ascorbato/glutation o Halliwell-Asada, y por tanto es determinante en las respuestas de adaptación a diferentes tipos de estrés (Smirnoff, 1996). Gracias a su función como donador de electrones tanto en reacciones enzimáticas como no-enzimáticas, al ascorbato se le atribuyen una gran cantidad de propiedades antioxidantes a través de su consumo, ya que los humanos son incapaces de sintetizarlo por sí mismos. Como se refleja en la Tabla 3.2 (ver apartado 3.3.3), los tomates crecidos en ambos invernaderos mostraron un incremento significativo en la concentración de ascorbato en el tercer muestreo (35 SDT) con respecto a los muestreos anteriores, siendo más

elevado en el invernadero parral durante todo el ciclo productivo. Estos datos coincidieron con las condiciones de estrés ambiental provocado por los valores más elevados en la temperatura, radiación solar y DPV (Fig. 3.4). A pesar de que existen estudios que no correlacionan una acumulación de ascorbato bajo condiciones de estrés ambiental (Adegoroye y Jolliffe, 1976; Hamauzu *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 2006), sí existen otros experimentos que concuerdan con nuestros resultados, donde bajo condiciones de elevada radiación solar y temperatura se incrementó el contenido en ascorbato como un mecanismo de respuesta antioxidante de aclimatación al estrés (Davey *et al.*, 2000; Dumas *et al.*, 2003). Así, nuestros resultados coinciden parcialmente con los obtenidos por Gautier *et al.* (2008), quienes concluyen que incrementando la radiación se promueve la acumulación de ascorbato en frutos de tomate cherry, mientras que un aumento en la temperatura (a 32°C) limita su acumulación.

Ya que los productos alimentarios son matrices, es apropiado medir la capacidad antioxidante total de las frutas y verduras para obtener un índice de sus beneficios para la salud (Molyneux *et al.*, 2004). Existe un gran número de ensayos que pueden ser usados para evaluar la capacidad antioxidante de los frutos de tomate, como son el FRAP, TEAC, DPPH y Poder Reductor. Uno de los mayores problemas que se presenta es escoger el método de análisis químico más adecuado ya que normalmente cada test es específico para una sola propiedad. Algunos de ellos están basados en la capacidad de inhibir la oxidación de un sustrato diana por parte de los radicales libres mientras que otros evalúan la capacidad de quelar metales o detoxificar radicales sintéticos. Por esta razón y con el fin de determinar la capacidad antioxidante de la manera más precisa posible, se recomienda el uso de varios métodos, más que depender de los resultados de un solo método antioxidante (Schleiser *et al.*, 2002; Blasco *et al.*, 2008).

En primer lugar, se realizó el análisis FRAP, ya que es considerado uno de los tests más rápidos y usados para determinar la actividad antioxidante (Rice-Evans, 2000). Este ensayo está basado en la reducción del complejo amarillo Fe^{3+} -TPTZ a un complejo de color azul, Fe^{2+} -TPTZ, por sustancias donadoras de electrones bajo condiciones ácidas. Por otra parte, también se

realizó el análisis TEAC, apoyado en la reducción del radical catiónico coloreado ABTS^{•+}. La capacidad antioxidante es cuantificada análogamente como la concentración de vitamina E soluble (Becker *et al.*, 2004). Otro ensayo utilizado en este estudio fue el DPPH, que mide la capacidad de detoxificación de ROS a través de diferentes compuestos. El DPPH se caracteriza por ser un radical libre estable de color púrpura oscuro, y se basa en la pérdida de color producida por la reducción del radical cuando es mezclado con una sustancia donadora de H⁺ (Martínez *et al.*, 2006). Finalmente se llevó a cabo el test del Poder Reductor, el cual está basado en la transición del Fe³⁺ a Fe²⁺ por la reducción del complejo ferricianida férrica al complejo ferricianida ferrosa que posee color azul y sirve como un indicador significativo de la actividad antioxidante potencial de un extracto, medida como % de actividad equivalente de ácido ascórbico (Meir *et al.*, 1995).

En nuestro experimento, observamos cómo los cuatro ensayos antioxidantes estudiados (FRAP, TEAC, DPPH y Poder Reductor) mostraron una tendencia similar, alcanzando los valores más elevados durante el tercer muestreo en ambos invernaderos (Tabla 4.2). Además, estos valores mostraron una mayor capacidad antioxidante en los frutos cultivados en el invernadero parral en comparación con el multitúnel (Tabla 4.2). Esto nos indica una mayor capacidad antioxidante durante este periodo de estrés producido por el incremento de las temperaturas, radiación solar y DPV, y coincidiendo con el aumento de otros parámetros antioxidantes como son los fenoles totales, los flavonoides y el ascorbato (Tablas 4.1 y 4.2).

Tabla 4.2. Ensayos de capacidad antioxidante (FRAP, TEAC, DPPH y Poder Reductor) en los frutos de tomate cherry cultivados en los dos invernaderos experimentales durante tres periodos diferentes de producción.

	FRAP ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PF)		TEAC ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PF)		DPPH (% g^{-1} PF)		Poder Reductor (abs a 700 nm g^{-1} PF)	
	Parral	Multitúnel	Parral	Multitúnel	Parral	Multitúnel	Parral	Multitúnel
Muestras								
M1	5.57 c	4.95 b	1.11 b	1.05 b	42.5 c	38.0 b	0.55 c	0.50 b
M2	6.51 b	5.55 b	1.39 b	1.17 b	55.7 b	44.2 b	0.69 b	0.56 b
M3	9.05 a	7.88 a	2.23 a	2.10 a	71.3 a	62.7 a	0.94 a	0.82 a
<i>P</i> -valor ²	***	***	***	***	***	***	***	***
LSD _{0.05}	0.81	0.91	0.46	0.32	10.9	10.8	0.11	0.10
Invernaderos								
Parral	7.04 a		1.58 a		56.5 a		0.73 a	
Multitúnel	6.13 b		1.44 a		48.3 b		0.63 b	
<i>P</i> -valor	**		NS		**		***	
LSD _{0.05}	0.54		0.25		6.05		0.06	

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

4.3.2. Efecto de las condiciones ambientales sobre el contenido de azúcares y ácidos orgánicos.

La preferencia de los consumidores está fuertemente influenciada por el sabor dulce-ácido característico de los frutos de tomate. Por ello, recientemente se ha manifestado una preocupación por la pobre calidad gustativa de los tomates frescos disponibles en los mercados de consumo (Wang *et al.*, 2007). Así, el sabor deseado de los tomates es el resultado de una interacción compleja entre varios compuestos volátiles y gustativos presentes en el fruto (Petro-Turza, 1986). Los azúcares reductores y los ácidos orgánicos son los componentes más significativos en la determinación del sabor dulce y ácido respectivamente, por lo que sus niveles de concentración pueden afectar significativamente a la aceptabilidad de su sabor (Salles *et al.*, 2003).

Tabla 4.3. Contenido en azúcares en los frutos de tomate cherry cultivados en los dos invernaderos experimentales durante tres periodos diferentes de producción.

Muestras	Glucosa (mg g⁻¹ PF)		Fructosa (mg g⁻¹ PF)		Sucrosa (mg g⁻¹ PF)	
	<u>Parral</u>	<u>Multitúnel</u>	<u>Parral</u>	<u>Multitúnel</u>	<u>Parral</u>	<u>Multitúnel</u>
M1	15.0 c ¹	17.4 b	17.2 c	18.6 b	1.97 a	1.96 a
M2	18.3 b	18.7 b	19.3 b	19.1 b	1.46 b	1.30 b
M3	22.3 a	24.0 a	22.3 a	23.7 a	0.82 c	1.14 c
<i>P</i> -valor ²	***	***	***	***	***	**
LSD _{0.05}	1.40	2.27	1.58	2.68	0.25	0.15
Invernaderos						
Parral	18.5 b		19.6 a		1.42 a	
Multitúnel	20.1 a		20.4 a		1.47 a	
<i>P</i> -valor	**		NS		NS	
LSD _{0.05}	1.05		1.24		0.26	

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

Generalmente, el fruto de tomate acumula azúcares en forma de sacarosa o de hexosas (glucosa y fructosa), dependiendo de las condiciones ambientales y de la fase de crecimiento de la planta (Davies y Hobson, 1981; Islam *et al.*, 1996). De todos los azúcares que se encuentran en los frutos de tomate, la fructosa es el que se encuentra en mayor proporción, ligeramente más abundante que la glucosa, mientras que la sacarosa suele existir en bajas cantidades (Bertin *et al.*, 2000).

En la Tabla 4.3 se muestra cómo la concentración de glucosa y fructosa en los frutos de tomate cherry incrementó progresivamente a lo largo del ciclo productivo en ambos invernaderos, alcanzando los valores más elevados en el tercer muestreo (35 SDT) y coincidiendo con las condiciones de los mayores

Tabla 4.4. Acidez valorable y contenido en ácidos orgánicos en los frutos de tomate cherry cultivados en los dos invernaderos experimentales durante tres periodos diferentes de producción.

	Acidez valorable (% citrato g ⁻¹ PF)		Ácido cítrico (mg g ⁻¹ PF)		Ácido málico (mg g ⁻¹ PF)	
	Parral	Multitúnel	Parral	Multitúnel	Parral	Multitúnel
Muestréos						
M1	0.65 a ¹	0.62 a	4.23 a	4.08 a	0.39 a	0.32 a
M2	0.59 a	0.64 a	3.59 b	4.20 a	0.32 ab	0.25 b
M3	0.48 b	0.46 b	2.87 c	2.82 b	0.27 b	0.20 c
<i>P</i> -valor ²	**	***	***	***	***	**
LSD _{0.05}	0.07	0.08	0.44	0.52	0.07	0.03
Invernaderos						
Parral		0.57 a		3.57 a		0.33 a
Multitúnel		0.58 a		3.70 a		0.25 b
<i>P</i> -valor		NS		NS		***
LSD _{0.05}		0.04		0.27		0.03

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

valores de los parámetros ambientales (Fig. 3.4). Este incremento en las concentraciones de hexosas coincidió con una disminución en el contenido en sacarosa en el tercer muestreo (Tabla 4.3), lo cuál nos puede indicar una degradación de sacarosa hacia glucosa y fructosa producida bajo estas condiciones de estrés ambiental. Nuestros datos concuerdan con los obtenidos por Winsor y Adams (1976), donde mostraron un incremento en el contenido en azúcares en frutos de tomate durante el verano, lo que indujo un aumento del sabor dulce de estos tomates (Tabla 4.3). Sin embargo, Gautier *et al.* (2008) indicaron que elevadas temperaturas no afectaron al contenido final de hexosas en los frutos de tomate cherry.

En cuanto a la acidez, observamos cómo tanto los valores de acidez valorable (AV) como el contenido en ácido cítrico y ácido málico fue inferior al final del periodo productivo (35 SDT; Tabla 4.4). Además, el índice de dulzor y el cociente azúcares/ácidos son dos parámetros muy utilizados en muchos frutos para describir su sabor y su aceptabilidad en el mercado (Keutgen y Pawelzik, 2008). Baldwin *et al.* (1998) consideran que la relación entre los azúcares y la acidez es un buen indicador para el sabor y el aroma de los tomates, y Mencarelli y Salveit (1988) señalaron que un valor bajo de azúcares/acidez está asociado a tomates insípidos. Por tanto, con estos parámetros comprobamos cómo los tomates cherry crecidos bajo condiciones de elevada temperatura, radiación solar y DPV (35 SDT; Fig. 3.4; ver capítulo 3.3.1) mostraron los valores más elevados en relación al índice de dulzor y del cociente azúcares/ácidos en ambos invernaderos (Tabla 4.5). Así, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Gautier *et al.* (2008), quienes proponen que un incremento en la temperatura (32°C) podría mejorar la calidad gustativa del fruto de tomate ya que aumenta el cociente azúcares/ácidos del fruto.

Tabla 4.5. Índices de sabor en los frutos de tomate cherry cultivados en los dos invernaderos experimentales durante tres periodos diferentes de producción.

Muestreros	Índice de dulzor		Azúcares/Ácidos	
	<u>Parral</u>	<u>Multitúnel</u>	<u>Parral</u>	<u>Multitúnel</u>
M1	57.1 c ¹	62.7 b	7.54 c	8.75 b
M2	64.8 b	63.6 b	10.5 b	8.78 b
M3	75.0 a	79.9 a	14.8 a	16.6 a
<i>P</i> -valor ²	***	***	***	***
LSD _{0.05}	4.67	7.79	2.05	2.02
Invernaderos				
Parral	65.5 a		10.9 a	
Multitúnel	68.7 a		11.4 a	
<i>P</i> -valor	NS		NS	
LSD _{0.05}	3.75		1.20	

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

Finalmente, observamos cómo tanto el contenido en azúcares como en ácidos orgánicos fue similar en los tomates cherry cultivados en ambos invernaderos (Tablas 4.3, 4.4 y 4.5), definiendo así una misma calidad en cuanto al sabor de estos frutos. Por tanto, nuestros resultados confirman que bajo estas condiciones de estrés ambiental se desarrolló un sabor dulce y suave en los frutos de tomate cherry, lo que conlleva una mejor calidad y aceptación por los consumidores.

3.3.3. Conclusión.

En resumen, las condiciones de estrés producidas durante el tercer muestreo (35 SDT) por el incremento de las temperaturas, radiación solar y VPD en ambos invernaderos desencadenaron una reducción en la acumulación de licopeno y un aumento en el contenido de otros fitonutrientes como los compuestos fenólicos y el ascorbato, y en la capacidad antioxidante de los frutos de tomate cherry. Este elevado contenido en fitonutrientes y la alta actividad antioxidante originada durante este periodo de estrés le confiere a estos tomates cherry un notable interés nutricional, que repercute de manera considerable en una mayor calidad nutricional y comercial de este producto hortícola. Por otro lado, al comparar ambos invernaderos observamos cómo los tomates cherry cultivados bajo el invernadero parral mejorado mostraron un mayor contenido en fenoles totales, flavonoides, antocianinas, ascorbato y una mayor capacidad antioxidante, no presentando diferencias significativas en cuanto al contenido en licopeno y β -caroteno (Tablas 3.2, 4.1 y 4.2). Estos resultados pueden indicar una mayor calidad nutricional en estos frutos acrecentada por las mayores condiciones de estrés ambiental desarrolladas bajo este invernadero durante el tercer muestreo. Por tanto, en este estudio demostramos cómo las condiciones ambientales pueden ser determinantes en la calidad nutricional del tomate cherry. Sin embargo, y a pesar del aumento de la mayoría de los fitonutrientes estudiados, observamos una reducción en el contenido de licopeno durante el tercer muestreo en ambos invernaderos. Por tanto, y aunque más investigación es necesaria al respecto, el mantenimiento en el contenido en licopeno sería fundamental para llegar conseguir la mejor calidad nutricional de los tomates cherry bajo condiciones experimentales de estrés ambiental.

Finalmente, bajo estas condiciones de estrés también se produjo una acumulación de azúcares y una disminución en el contenido en ácidos orgánicos, lo que derivó en un sabor dulce y suave de los frutos, mejorándose las propiedades organolépticas de los tomates cherry en ambos invernaderos.

INTERPRETACIÓN DEL BLOQUE II

El control de las condiciones climáticas en el interior de los invernaderos mediterráneos es un problema debido a la gran intensidad de la radiación solar, a las elevadas temperaturas y al alto DPV del aire durante el verano, los cuáles pueden influir tanto en la producción como en la calidad nutricional de los frutos de tomate cherry, e incluso desencadenar situaciones de estrés ambiental. A lo largo del ciclo de cultivo hemos podido comprobar cómo se produjo un incremento progresivo en los valores de estas tres variables ambientales, mostrando los valores más elevados al final del periodo de producción (35 SDT; Fig. 3.4). Durante el tercer muestreo, las temperaturas en ambos invernaderos excedieron el óptimo de crecimiento del tomate, el cuál está definido entre 23 y 26°C (Maroto, 1995), coincidiendo con un aumento en los valores de radiación solar y DPV, por lo que en nuestro experimento (como hemos indicado anteriormente) se podrían haber desencadenado ciertos desórdenes metabólicos y fisiológicos que afectarían a la producción (Boyer, 1982). A pesar de que estas condiciones podrían inducir una situación de estrés abiótico en el interior de los invernaderos, no encontramos una reducción significativa en la producción total de tomates cherry en ambos invernaderos al final del periodo de estudio (35 SDT; Fig. 3.5.A). Sin embargo, en el tercer muestreo se produjo un incremento en la producción no-comercial de frutos de tomate cherry en ambos invernaderos, y en el invernadero parral se encontró una reducción significativa en la producción comercial (Fig. 3.5). Por ello, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas de producción entre ambos invernaderos, en el invernadero multitúnel se observaron los valores más elevados de producción total y comercial, y más bajos de producción no-comercial (Fig. 3.7), mostrándose una ganancia de 23.6 t ha⁻¹ de tomates cherry de calidad comercial en el invernadero multitúnel durante tres años en comparación con el parral, que desde un punto de vista agronómico supone un beneficio más que evidente.

Este incremento en la producción no-comercial al final del periodo productivo, y más concretamente en el invernadero parral, puede indicar la posible presencia de un estrés abiótico producido por el aumento de la temperatura, radiación solar y DPV (Fig. 3.4), la cuál podría desencadenar una

serie de desórdenes metabólicos y fisiológicos que pueden producir una reducción en la calidad nutricional de los frutos de tomate cherry.

La peroxidación de lípidos es un indicador fiable de la presencia de un estrés abiótico. En nuestro experimento, los resultados obtenidos indican que tanto el contenido en MDA como la actividad LOX aumentaron durante el tercer muestreo en ambos invernaderos (Tabla 3.1), siendo más elevado en el invernadero parral durante todo el periodo productivo, lo cuál nos sugiere un posible estrés oxidativo provocado por el incremento en las temperaturas, radiación solar y DPV. Además, al igual que la peroxidación de lípidos, el contenido en H₂O₂ también aumento durante el tercer muestreo en ambos invernaderos (Tabla 3.3), indicando un aumento en la actividad oxidativa. Ante una situación de estrés, el ascorbato es uno de los principales compuestos involucrados en la respuesta antioxidante. Así, observamos cómo la concentración de ascorbato total y ASA incrementó significativamente en el tercer muestreo en ambos invernaderos (Tabla 3.2), coincidiendo con un ligero incremento en el contenido en DHA en el invernadero parral. En el tercer muestreo, la actividad de las enzimas SOD, CAT y APX incrementó significativamente en los tomates cherry cultivados en ambos invernaderos (Tabla 3.3), mostrándose la mayor actividad de las enzimas CAT y APX en los tomates cherry cultivados en el invernadero parral (Tabla 3.3). Finalmente, también se mostró un incremento significativo durante el tercer muestreo de solutos osmoprotectores, como la prolina y los azúcares reductores, y una mayor degradación de sacarosa en los tomates cherry en ambos invernaderos (Fig. 3.8; Tabla 3.4), sugiriendo nuevamente la presencia de un estrés ambiental en este periodo. Por tanto, la interpretación conjunta de todos estos datos nos indica la presencia de un posible estrés ambiental y el desarrollo de mecanismos de defensa antioxidante, siendo más acusado en el invernadero parral mejorado y durante el tercer muestreo, provocado por la exposición a las condiciones ambientales desfavorables de elevada temperatura, radiación solar y DPV.

Otro capítulo que hemos tratado en este bloque y que se considera determinante en el valor agronómico de este cultivo hace referencia a la calidad

nutricional del fruto de tomate cherry, ya que como hemos descrito anteriormente los tomates son beneficiosos para la salud humana gracias a su elevado contenido en fitonutrientes y su capacidad antioxidante. Así, durante el tercer muestreo observamos en ambos invernaderos una disminución en el contenido de licopeno en los frutos de tomate cherry, mientras que se incrementó el contenido de fenoles totales, flavonoides, antocianinas (sólo en el parral), ácido ascórbico y capacidad antioxidante (FRAP, TEAC, DPPH y Poder Reductor), siendo más elevados en el invernadero parral durante todo el periodo productivo (Tablas 4.1 y 4.2). El contenido de β -caroteno también aumentó en el invernadero multitúnel durante el tercer muestreo (Tabla 4.1), lo que indica un aumento en la oxidación de licopeno a β -caroteno bajo estas condiciones de estrés; sin embargo, además del aumento en la oxidación de licopeno a β -caroteno, en el invernadero parral también se podría haber producido un aumento en la degradación de β -caroteno que explicaría la ausencia de un aumento significativo de este pigmento durante el tercer muestreo (Tabla 4.1). Por tanto, y según nuestros resultados, podemos definir a estas condiciones de estrés provocadas por las elevadas temperaturas, radiación solar y DPV como las principales responsables del incremento en la capacidad antioxidante y en fitonutrientes como el ácido ascórbico, fenoles totales, flavonoides y antocianinas (este último en el caso del invernadero parral), producido como un posible mecanismo de respuesta fisiológica de aclimatación a este tipo de estrés ambiental.

El sabor también es un parámetro importante de gran demanda entre los consumidores. Así, observamos cómo bajo las condiciones de estrés ambiental la concentración de glucosa y fructosa en los frutos de tomate cherry alcanzó sus valores más elevados en ambos invernaderos, mientras que el contenido en sacarosa decreció, indicando una evidente degradación de sacarosa (Tabla 4.3). Por otro lado, tanto la acidez valorable como los contenidos en ácido cítrico y ácido málico fueron inferiores durante el tercer muestreo (Tabla 4.4). Por tanto, con estos parámetros comprobamos cómo los tomates cherry crecidos bajo condiciones de elevada temperatura, radiación solar y DPV, y sin encontrar diferencias entre ambos invernaderos, mostraron los valores más

elevados en relación al índice de dulzor y del cociente azúcares/ácidos en ambos invernaderos (Tabla 4.5), mostrando un sabor más dulce y suave.

En conclusión, a pesar de no encontrar diferencias significativas en la producción de tomates cherry entre los dos invernaderos durante los tres periodos de estudio, es importante destacar la pérdida de producción comercial en el invernadero parral mejorado al final del periodo productivo y la ganancia de 23.6 t ha⁻¹ en el invernadero multitúnel, lo cuál podría sugerir la ventaja agronómica de este último invernadero. Sin embargo, los valores más elevados de temperatura, radiación solar y DPV durante todo el ciclo productivo que desencadenaron las mayores condiciones de estrés ambiental (definido por los valores más elevados de los indicadores de estrés estudiados y de respuesta antioxidante) en el invernadero parral mejorado provocaron una mayor calidad nutricional en los frutos de tomate cherry, definida por un mayor contenido en fenoles totales, flavonoides, antocianinas, ascorbato y una mayor capacidad antioxidante, y por tanto una mayor importancia tanto en el consumo humano como en la aceptabilidad en el mercado.

BLOQUE III

Durante la realización del experimento observamos cómo en el primer año de cultivo (2003-2004) se produjeron las mayores condiciones de estrés ambiental en el interior del invernadero parral mejorado, producido principalmente por un notable incremento en la temperatura y en la radiación solar. Ya que existen muy pocos estudios específicos de cómo estas variables ambientales influyen sobre los mecanismos de respuesta al estrés en los frutos de tomate, decidimos profundizar en las respuestas metabólicas y fisiológicas que se podrían haber desencadenado con motivo de esta situación de estrés. También es importante destacar que este estudio se centró en el exocarpo del fruto de tomate cherry debido a su mayor exposición a las condiciones ambientales externas, y a su elevado contenido en compuestos antioxidantes, mucho mayor que en otras fracciones del fruto como son el mesocarpo y el endocarpo. Por tanto, en este bloque los tres mecanismos de respuesta estudiados fueron: el contenido en antioxidantes y el metabolismo del ascorbato, el metabolismo de la prolina y la degradación de los azúcares, en base a estudios que los relacionan con la resistencia de las plantas superiores sometidas a condiciones de estrés ambiental.

Finalmente, debemos indicar que los tres capítulos que se desarrollan en este bloque corresponden a las traducciones de tres artículos publicados en revistas internacionales:

- Journal of the Science of Food and Agriculture 86, 1545-1551 (2006).
- The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 82, 739-744 (2007).
- Scientia Horticulturae 113, 244-249 (2007).

CAPÍTULO 5

CONTENIDO EN ANTIOXIDANTES Y METABOLISMO
DEL ASCORBATO EN EL EXOCARPO DE TOMATE CHERRY
EN RELACIÓN A LA TEMPERATURA Y A LA RADIACIÓN SOLAR

5.1. INTRODUCCIÓN.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta hortícola anual de amplia distribución mundial y de elevado valor económico. Según la FAO, el tomate es el segundo vegetal más cultivado en el mundo, después de la patata, con una producción anual de cerca de 10^8 t de tomate fresco en 3.7×10^6 ha en todo el mundo, siendo China, EE.UU. y Turquía los países con mayor producción (FAO, 2004). Además de su importancia económica, estudios recientes demuestran los efectos beneficiosos para la salud humana a través del consumo de tomate, gracias a su contenido en fitonutrientes como el licopeno, β -caroteno, flavonoides, vitamina C y otros nutrientes esenciales. Esta composición es la principal responsable de su alta capacidad antioxidante, tanto en tomate fresco como procesado (Beutner *et al.*, 2001; Gahler *et al.*, 2003), y por lo tanto, de la reducción en la aparición de ciertos tipos de cáncer y de enfermedades cardiovasculares (Heber, 2000; Rao y Agarwal, 2000).

Los tomates constituyen la mayor fuente de licopeno, un carotenoide con gran capacidad de eliminar los ROS, de acuerdo con los estudios realizados por Rao *et al.* (1998) y por Toor y Savage (2005). El licopeno también es el responsable del enrojecimiento del fruto, debido a la diferenciación de los cloroplastos a cromoplastos, por eso este carotenoide es muy importante con respecto a la calidad nutricional final y de mercado de este producto hortícola (Dumas *et al.*, 2003). Por lo tanto, diferentes trabajos han indicado que el grado de calidad del tomate está altamente relacionado con su contenido en licopeno (George *et al.*, 2003, Gautier *et al.*, 2005). Otro carotenoide presente en los frutos de tomate es el β -caroteno, aunque tiene una menor importancia que el licopeno puesto que constituye solamente un 7% del contenido total de carotenoides del tomate (Bilton *et al.*, 2001). Los flavonoides, como las antocianinas, también juegan un papel importante como compuesto antioxidante, realizando funciones de protección frente el estrés oxidativo en las plantas, actuando como un fotoprotector que absorbe la luz verde-anaranjada del espectro visible y evitando así la foto-oxidación de las clorofilas (Merzlyak y Chivkunova, 2000).

Sin embargo, el antioxidante más efectivo de los diferentes productos vegetales es el ácido ascórbico o vitamina C (Smirnoff, 1996). Este compuesto, además de estar involucrado de forma directa en la eliminación de ROS y en la regeneración de la vitamina E en las plantas (Asada, 1994), interviene en el metabolismo celular y en el control del crecimiento (Navas y Gomez-Diaz, 1995), en la división celular (Kerk y Feldman, 1995), en la expansión de la pared celular (Takahama y Oniki, 1994) y en la organogénesis (Joy *et al.*, 1988). En cuanto a su papel como antioxidante, el ácido ascórbico elimina directamente el anión superóxido, y también el radical hidroxilo y el oxígeno singlete, y reduce el peróxido de hidrógeno a agua mediante la reacción de la APX (Noctor y Foyer, 1998; Conklin y Barth, 2004).

Uno de los procesos fisiológicos que pueden alterar o reducir de forma importante la calidad nutricional y la actividad antioxidante de los diferentes productos vegetales destinados al consumo humano es el estrés oxidativo. Los factores ambientales que causan el estrés oxidativo incluyen la contaminación aérea (ozono y dióxido de azufre), la aplicación de herbicidas, la presencia de metales pesados, la sequía, la salinidad, la aparición de lesiones, la luz UV, el temperaturas extremas y la foto-inhibición producida por una radiación solar excesiva (Buchanan *et al.*, 2000; Apel y Hirt, 2004). De entre todos estos factores, la temperatura y la radiación solar son fundamentales en los agrosistemas de cultivo intensivos, como los invernaderos, donde se desarrolla la mayor parte del cultivo del tomate (Adams *et al.*, 2001; Lee y Chen, 2002). Aunque existen pocos estudios específicos de cómo estas variables ambientales influyen sobre la actividad antioxidante en frutos de tomate, se conoce que la exposición a elevadas temperaturas da lugar a una disminución en la síntesis de licopeno y un aumento de su degradación a β -caroteno, provocada por la presencia de ROS (Lee y Chen, 2002; Dumas *et al.*, 2003; Gautier *et al.*, 2005). Además, se ha observado que el incremento en la actividad LOX producido en estas condiciones va a conllevar además un aumento en la peroxidación de lípidos y, por tanto, la muerte celular y posterior necrosis de los tejidos (Fu and Huang, 2001; Mittler, 2002). Por otro lado, y específicamente en el exocarpo, se ha comprobado que el aumento de la radiación solar bloquea la acumulación de licopeno, lo cuál induce la formación

de zonas decoloradas, comúnmente conocidas como “mancha solar”. Aunque existe escasa información bibliográfica al respecto, se sabe que la mancha solar se manifiesta en el fruto maduro de tomate como anillos amarillo-anaranjados que rodean la zona de abscisión y responden a una reducción de la síntesis de licopeno o un aumento en la oxidación de este compuesto a β -caroteno (Adegroye y Jolliffe, 1983; Dumas *et al.*, 2003). Esta fisiopatía es la causa de importantes pérdidas para los productores y los consumidores (Humauzu *et al.*, 1998).

Por lo tanto, y considerando la importancia económica y nutricional del cultivo de tomate y sus productos alimentarios, en este trabajo se evaluó el impacto de la temperatura y la radiación solar sobre la actividad antioxidante, la peroxidación de lípidos y el metabolismo del ácido ascórbico en los frutos de tomate cherry. El estudio se centró en la fracción exocárpica del fruto de tomate debido a su elevado contenido en antioxidantes (como el licopeno), mayor que en otras fracciones del fruto, como son el mesocarpo y el endocarpo (Dumas *et al.*, 2003; Toor y Savage, 2005). El objetivo final fue definir las condiciones óptimas de temperatura y radiación solar con el fin de proporcionar la mayor calidad nutricional y producción comercial de frutos de tomate cherry.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.2.1. Diseño experimental y condiciones de crecimiento.

Las semillas de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* cv. Naomi) se sembraron en bandejas planas (tamaño de celda 3 x 3 x 10 cm) rellenas con una mezcla de turba y vermiculita 50% (v/v), y se mantuvieron en un semillero durante 4 semanas. Transcurrido este tiempo, el 23 de Septiembre de 2004 las plántulas se trasplantaron a un invernadero experimental tipo parral mejorado, manteniendo el cultivo durante aproximadamente nueve meses. Tanto la descripción del invernadero parral mejorado como agronomía del cultivo se encuentran explicados más detalladamente en el apartado 3.2.

5.2.2. Muestreo de los frutos y medida de los parámetros ambientales.

Los frutos de tomate cherry se recogieron tres veces durante todo el ciclo de cultivo: 7 Enero 2004 [85 días después del transplante (DDT)], 22 Marzo 2004 (160 DDT) y 30 Mayo 2004 (229 DDT), fechas correspondientes respectivamente a los periodos inicial, intermedio y final de la estación de cosecha, evitando así la primera cosecha y el periodo final de senescencia de las plantas. De las plantas se recogieron los tomates cherry de calidad comercial y con el mismo estado de maduración, descartando los frutos dañados y los verdes del final del racimo, los cuáles fueron seleccionados aleatoriamente en toda la superficie de cultivo de los invernaderos experimentales. Una vez en el laboratorio fueron lavados tres veces con agua destilada después de una desinfección con Decon 90 (Merck) al 1% (Wolf, 1982) y secadas con papel de filtro seco. Las muestras de tejido fresco de la fracción exocárpica de los frutos de tomate cherry se usaron para analizar los parámetros descritos más abajo.

Durante todo el periodo de cultivo se realizaron medidas de temperatura y radiación solar, según se describe en el apartado 3.2.4.

5.2.3. Análisis vegetal.

5.2.3.1. Pigmentos vegetales.

El contenido en licopeno, β -caroteno y antocianinas en el exocarpo de los frutos de tomate cherry se determinó según se describe en los apartados 4.2.2.1 y 4.2.2.3.

5.2.3.2. Peroxidación de lípidos.

Para la medida de la peroxidación de lípidos en el exocarpo de los frutos de tomate cherry se realizaron los métodos descritos anteriormente en el apartado 3.2.6.1.

5.2.3.3. Metabolismo del ascorbato.

El ASA, DHA y ascorbato total (ASA+DHA) se determinaron como se describe en el apartado 3.2.6.2.

La cuantificación del contenido en H_2O_2 se realizó de acuerdo al método presentado en el apartado 3.2.6.3.

El ensayo de la enzima APX se encuentra explicado anteriormente en el apartado 3.2.6.4.

La extracción de las enzimas dehidroascorbato reductasa (DHAR, EC 1.8.5.1) y monodehidroascorbato reductasa (MDHAR, EC 1.6.5.4) se realizó mediante una homogenización de 0.2 g de exocarpo de tomate cherry en el siguiente tampón de extracción: 100 mM tampón fosfato potásico pH 7.0, 0.1 mM EDTA- Na_2 , 1 mM PhenylMethaneSulfonyl Fluoride (PMSF), 1 mL Tritón-X-100 al 0.5% y PVPP al 5% (w/v). Después se procedió a la centrifugación de las muestras a 9500 rpm durante 20 min.

La determinación de la actividad DHAR se realizó según el método descrito por Miyake y Asada (1992) con algunas modificaciones. Para ello, se realizó una mezcla de reacción que contenía 50 mM de Heppes-Na/KOH pH 7.0, 0.1 mM EDTA-Na₂, 2.5 mM glutation reducido y 0.2 mM DHA. La reacción enzimática se inició al añadir 0.15 mL de extracto enzimático a la mezcla de reacción, y se midió el cambio de absorbancia a 265 nm ($\epsilon = 7.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El resultado se expresó en $\mu\text{mol DHA reducido g}^{-1} \text{ PF min}^{-1}$.

Para el ensayo de la actividad MDHAR se utilizó el método basado en Foyer *et al.* (1989), en el cuál se realizó una mezcla de reacción que contenía 100 mM Heppes/KOH pH 7.6, 80 U ascorbato oxidasa, 2.5 mM ácido ascórbico y 0.025 mM NADPH. Para iniciar la reacción se añadió 0.3 mL del extracto enzimático y se registró el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados se expresaron como nmol NADPH oxidados $\text{g}^{-1} \text{ PF min}^{-1}$.

La actividad de la enzima ascorbato oxidasa (AO) se realizó de acuerdo a una versión modificada del método de García-Pineda *et al.* (2004), basado en la medida del ascorbato reducido a 265 nm. Para la extracción de la enzima se homogenizaron 0.2 g de exocarpo en 5 mL del siguiente tampón de extracción: 20 mM tampón fosfato potásico pH 5.6, 0.5 mM PMSF y PVPP al 5% (w/v). Las muestras se agitaron y se mantuvieron en hielo durante 20 min, agitándolas cada 2 min, y pasado este tiempo se centrifugaron a 11.200 rpm durante 5 min, filtrando y conservando el sobrenadante a 4°C. Por otro lado, para medir la actividad AO asociada a la pared celular, el precipitado obtenido en la centrifugación se lavó dos veces con el tampón de extracción (5 mL + 5 mL) y se resuspendió en 5 mL del siguiente tampón: 20 mM fosfato potásico pH 5.6, 0.5 mM PSMF y 1M Cl₂Ca. Posteriormente, se mantuvo 20 min a 4°C agitando cada 2 min y se centrifugó a 11.200 rpm durante 5 min. Para la determinación de las actividades AO tanto citosólica como de la pared celular, se realizó el siguiente ensayo: 0.3 mL de extracto enzimático y 2 mL de una mezcla de reacción consistente en: tampón 0.025 M citrato-0.05 M fosfato sódico a pH 5.6, 0.089 mM ácido ascórbico, 0.02 mM EDTA-Na₂ y 0.015% BSA. Finalmente, se midió la disminución de absorbancia a 265 nm, con un

coeficiente de extinción de $9246 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y los resultados se expresaron como nmol ASA oxidado $\text{g}^{-1} \text{ PF min}^{-1}$.

5.2.3.4. Actividad antioxidante.

Los dos ensayos de actividad antioxidante FRAP y DPPH se determinaron según los métodos descritos en los apartados 4.2.2.5 y 4.2.2.6.

5.2.3.5. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias de los tres muestreos se compararon mediante el test de rango múltiple de Duncan (DMRT; $P < 0.05$). Además, las medias han sido comparadas mediante el test de diferencias significativas mínimas de Fisher (LSD). Los niveles de significación se han representado mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.3.1. Descripción de la temperatura y la radiación solar y sus efectos sobre la producción.

Durante el periodo de estudio, los valores de temperatura máxima del aire en el interior del invernadero se incrementaron en el tercer muestreo (229 DDT) (Fig. 5.1.A). Sin embargo, aunque las temperaturas mínimas variaron poco a lo largo del ciclo productivo del fruto, si se observó un ligero incremento al final del periodo productivo (Fig. 5.1.A). Al final del ciclo de producción la temperatura del interior del invernadero excedió el óptimo para el crecimiento del tomate, que está definido entre 23 y 26°C (Maroto, 1995), y por tanto en nuestro experimento, se podrían haber desencadenado ciertos desórdenes metabólicos y fisiológicos, que afectaría también a la producción de frutos (Boyer, 1982). Otra variable ambiental vital para el crecimiento óptimo y para el desarrollo de los cultivos en invernadero es la radiación solar (Adegroye y Jolliffe, 1983; Berninger, 1989). Los datos muestran un incremento progresivo a lo largo del periodo productivo mostrando los valores más elevados al final de dicho periodo, durante el tercer muestreo de la cosecha (229 DDT; Fig. 5.1.B).

En relación a la producción comercial, a pesar de que las condiciones ambientales de temperatura y radiación solar en el interior del invernadero podrían inducir la aparición de un estrés abiótico, en nuestro trabajo no observamos variaciones significativas en ninguno de los muestreos (Fig. 5.2). De hecho, nuestros resultados se oponen a los resultados de Rainwater *et al.* (1996) y de Adams *et al.* (2001), quienes obtuvieron pérdidas de producción en las plantas de tomate cuando la temperatura del aire superó los 26°C.

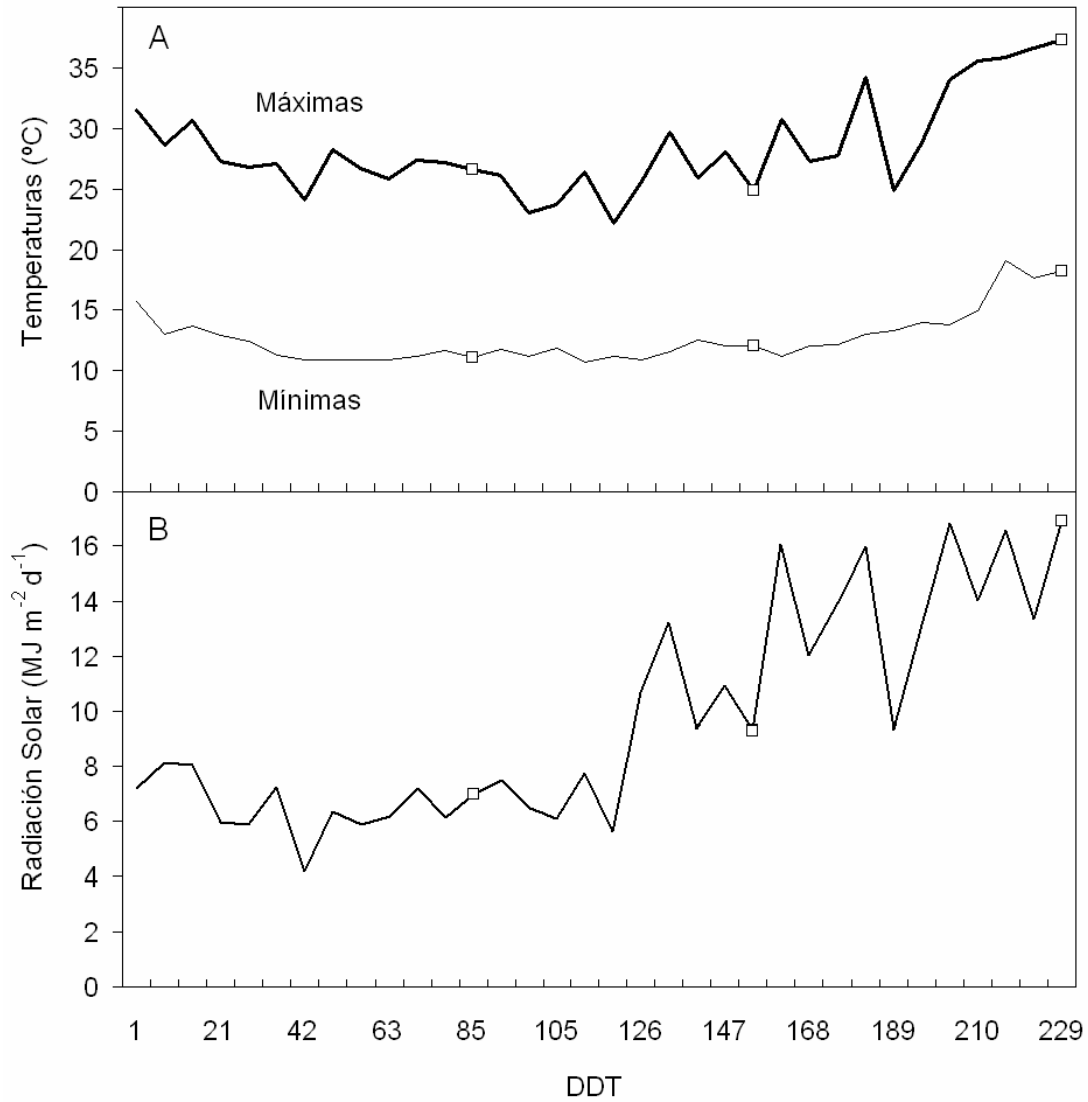


Figura 5.1. Valores de temperaturas máximas y mínimas y de radiación solar global recogidos en el interior del invernadero parral mejorado en el primer ciclo de cultivo (periodo 2003-2004). (DDT, días después del trasplante).

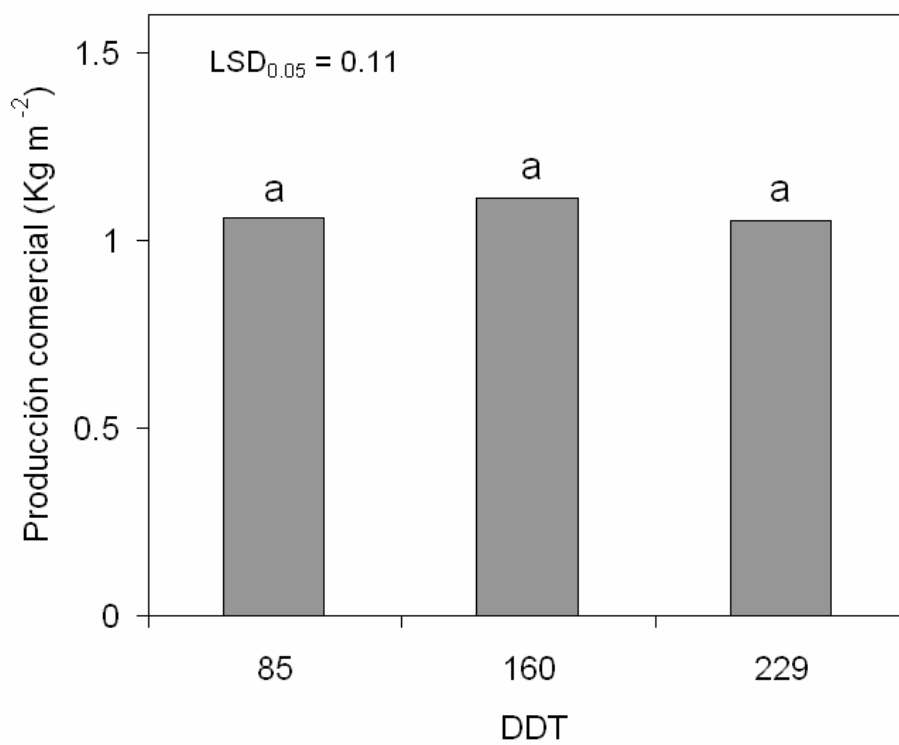


Figura 5.2. Producción comercial de frutos de tomate cherry en los tres periodos de producción muestreados en el invernadero parral durante el primer ciclo de cultivo (periodo 2003-2004). (DDT, días después del transplante).

5.3.2. Efecto de la temperatura y la radiación solar sobre el contenido en antioxidantes y la peroxidación de lípidos.

Como hemos indicado en la introducción, los carotenoides como el β -caroteno y principalmente el licopeno resultan esenciales para evaluar la calidad nutricional del fruto de tomate dada su actividad antioxidante (Toor y Savage, 2005). Al contrario que la producción, tanto el licopeno como el β -caroteno se vieron afectados por las variaciones de temperatura y radiación solar en el invernadero, presentándose una disminución significativa en sus contenidos al tercer muestreo (229 DDT, Tabla 5.1). Nuestros resultados son similares a los obtenidos en otros estudios realizados en frutos de tomate, como en el caso de los tomates cherry, donde se ha comprobado que a partir de 32°C se produjo una degradación de licopeno, presentándose su máximo contenido en frutos entre 17 y 26°C (Dumas *et al.*, 2003). Respecto al contenido y síntesis de β -caroteno se ha demostrado que se produce una inhibición y por tanto una reducción de este pigmento a partir de 40°C (Gautier *et al.*, 2005). Por otro lado, la radiación solar también tiene un fuerte efecto sobre el contenido de carotenoides. Así, la exposición de los frutos de tomate a una radiación solar intensa induce el sobrecalentamiento de su superficie, inhibiéndose la síntesis de carotenoides e induciendo la formación de zonas de coloración defectiva, más conocidas como mancha solar (Dumas *et al.*, 2003). Por lo tanto, la reducción en el contenido tanto de licopeno como de β -caroteno en la fracción exocárpica de frutos de tomate cherry a los 229 DDT (Tabla 5.1), donde se presentan los máximos valores de temperatura y radiación solar (Fig. 5.1), puede explicar la formación de frutos con zonas de coloración defectiva o mancha solar, produciéndose esta fisiopatía en el 70% de todos los frutos en este periodo (datos no mostrados). Finalmente, de acuerdo con otros estudios (Dumas *et al.*, 2003; Toor y Savage, 2005), en nuestro experimento la concentración de estos carotenoides en las fracciones mesocárpica y endocárpica fueron más bajas que aquellas presentes en el exocarpo, aunque estas fracciones registraron un descenso en las concentraciones de licopeno y β -caroteno en el tercer muestreo (datos no mostrados).

Tabla 5.1. Contenido en pigmentos antioxidantes en la fracción exocárpica de frutos de tomate cherry en tres estadios productivos diferentes durante el ciclo de cultivo.

	Licopeno ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)	β -caroteno ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)	Antocianinas (abs g^{-1} PF)
M1 (85 DDT)	19.8 a ¹	7.37 a	0.026 a
M2 (160 DDT)	17.1 a	7.66 a	0.026 a
M3 (229 DDT)	12.1 b	5.76 b	0.023 a
<i>P</i> -valor ²	*	*	NS
LSD _{0.05}	4.24	1.24	0.007

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

Otro grupo de compuestos que actúa como antioxidantes y fotoprotectores frente a diferentes tipos de estreses ambientales son las antocianinas (Merzlyak y Chivkunova, 2000). La relación entre el contenido en antocianinas y la temperatura del aire ha sido analizada recientemente por Pan *et al.* (2004), quienes observaron una reducción progresiva en el contenido de estos flavonoides en frutos frescos a temperaturas que variaban de 30 a 45°C. Ellos consideraron que esto explicaría la aparición de un daño oxidativo. En nuestro trabajo, el contenido en antocianinas de la fracción exocárpica de frutos de tomate cherry permaneció constante durante todo el periodo productivo (Tabla 5.1), independientemente de las variaciones de temperatura y radiación solar recogida en el interior del invernadero.

Bajo condiciones de estrés ambiental, la generación de ROS es la responsable de la aparición de daños inducidos en las macromoléculas y finalmente en la estructura celular (Mittler, 2002). El análisis de la peroxidación de lípidos expresado como actividad LOX y contenido en MDA indica la prevalencia y activación de los ROS en los tejidos como consecuencia de un estrés oxidativo (Fu y Huang, 2001). Nuestros resultados indican que tanto la actividad LOX como el contenido en MDA aumentaron en el tercer muestreo en

el invernadero, coincidiendo con los valores más elevados de temperatura y radiación solar (Tabla 5.2). Este incremento en la peroxidación de lípidos a los 229 DDT indica claramente la existencia de un estrés oxidativo, provocado por las altas temperaturas y la fuerte radiación solar, el cuál puede explicar la reducción en el contenido de carotenoides como el licopeno y el β -caroteno, y por tanto la aparición de mancha solar. En definitiva, los valores de temperatura y radiación solar alcanzados durante el tercer muestreo en el invernadero causaron una reducción importante en la calidad nutricional de los frutos tomate cherry, puesto que el contenido de los antioxidantes licopeno y β -caroteno disminuyó significativamente en el exocarpo (Tabla 5.1), con un aumento significativo en la peroxidación de lípidos (Tabla 5.2). Sin embargo, esto no afectó a la producción comercial de frutos obtenida durante el ciclo de cultivo (Fig. 5.2). Por tanto, según nuestros resultados el desarrollo del cultivo de tomate cherry en invernaderos mejorados tecnológicamente capaces de mantener unos niveles óptimos de temperatura y radiación solar (en nuestro trabajo representado a los 160 DDT) podría limitar la reducción del contenido en carotenoides y así mejorar la calidad nutricional, particularmente al final del periodo productivo de este cultivo.

Tabla 5.2. Peroxidación de lípidos en la fracción exocárpica de frutos de tomate cherry en tres estadios productivos diferentes durante el ciclo de cultivo.

	MDA (mol Kg ⁻¹ PF)	LOX (U Kg ⁻¹ PF)
M1 (85 DDT)	80.7 b ¹	23.2 b
M2 (160 DDT)	76.3 b	24.4 b
M3 (229 DDT)	104.9 a	36.7 a
<i>P</i> -valor ²	*	**
LSD _{0.05}	16.5	6.61

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

5.3.3. Efecto de la temperatura y la radiación solar sobre el metabolismo del ácido ascórbico.

En plantas superiores, el ascorbato tiene una mayor importancia que los compuestos antioxidantes discutidos anteriormente. Este compuesto está involucrado de forma directa en la eliminación de los ROS a través del ciclo ascorbato/glutation o ruta de Halliwell-Asada (Halliwell y Gutteridge, 1989), y por lo tanto su metabolismo es determinante en las respuestas de adaptación a diferentes tipos de estrés. El compuesto principal de este ciclo es el ASA, que es capaz de inactivar directamente el H_2O_2 generando monodehidroascorbato (MDHA) mediante la enzima APX. Este MDHA puede regenerar directamente a ASA gracias a la actuación de la enzima MDHAR o bien puede transformarse de forma espontánea en DHA que es reducido por la DHAR produciendo ASA (Asada, 1994; Foyer y Noctor, 2005). Por otro lado, el ASA puede ser transportado hacia el apoplasto, lugar donde se encuentra la enzima ascorbato oxidasa (AO), la cuál produce MDHA y DHA. Este DHA es entonces transportado al citoplasma y vuelve a ser reducido a ASA gracias a la actuación de la enzima DHAR (Foyer y Noctor, 2005; Green y Fry, 2005).

En la Tabla 5.3 se muestran los valores de las diferentes formas de ascorbato así como la actividad de las diferentes enzimas encargadas de su oxidación y regeneración a su forma reducida. Como se refleja en esta tabla, la concentración de ascorbato total incrementó significativamente en el tercer muestreo respecto al resto de los muestreos (Tabla 5.3), debido a que el DHA incrementó en el último muestreo y la forma reducida ASA permaneció constante en los tres muestreos de tomate realizados durante el ciclo productivo de esta planta (Tabla 5.3). En el mesocarpo y endocarpo de los frutos de tomate cherry se obtuvieron unos datos similares a los descritos en el exocarpo, aunque las concentraciones en las diferentes formas de ascorbato fueron más bajas (datos no mostrados). La acumulación de DHA en el tercer muestreo también coincide con un incremento en las concentraciones de H_2O_2 en el exocarpo de los frutos (Tabla 5.3), el cuál podría haber sido causado por el estrés, explicando en cierta medida el incremento en las actividades APX y

Tabla 5.3. Formas del ácido ascórbico y concentración de H₂O₂ en la fracción exocárpica de los frutos de tomate cherry en tres estadios diferentes del periodo de producción de frutos.

	Ascorbato total (mmol g ⁻¹ PF)	ASA (mmol g ⁻¹ PF)	DHA (mmol g ⁻¹ PF)	H ₂ O ₂ (μmol g ⁻¹ PF)
M1 (85 DDT)	2.72 b ¹	2.23 a	0.49 b	60.9 b
M2 (160 DDT)	3.12 ab	2.01 a	1.11 a	51.1 b
M3 (229 DDT)	3.72 a	2.17 a	1.55 a	72.7 a
<i>P</i> -valor ²	*	NS	**	**
LSD _{0.05}	0.90	0.44	0.53	11.2

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

MDHAR, las cuáles participan en su detoxificación (Tabla 5.4). Por consiguiente, el incremento en la oxidación de ascorbato durante el tercer muestreo se explica claramente por el aumento en las actividades APX y AO en este periodo (Tabla 5.4). Por el contrario, la regeneración del ASA a partir del DHA fue inhibido en el tercer muestreo puesto que la actividad encargada de este proceso (DHAR) disminuyó significativamente en este muestreo (Tabla 5.4). Sin embargo, entre el segundo y tercer muestreo, detectamos un aumento en la actividad MDHAR, la cuál podría colaborar en la regeneración del ASA a los 229 DDT (Tabla 5.4). Los resultados obtenidos muestran un incremento en la actividad de las enzimas APX y AO, y por lo tanto una acumulación de DHA, lo cuál indica la presencia de condiciones de estrés en el tercer muestreo, produciendo así una inducción en el proceso de detoxificación de ROS (Jin *et al.*, 2003). Sin embargo, la reducción en la regeneración del ASA por las enzimas DHAR y MDHAR a los 229 DDT podría perjudicar la capacidad de adaptación de los frutos a las elevadas temperaturas y fuerte radiación solar existentes en el invernadero parral durante el tercer muestreo. En definitiva, la oxidación aumentada de ASA por parte de la APX en la fracción exocárpica de

Tabla 5.4. Formas del ácido ascórbico y concentración de H₂O₂ en la fracción exocárpica de los frutos de tomate cherry en tres estadios diferentes del periodo de producción de frutos.

	APX	DHAR	MDHAR	AO
M1 (85 DDT)	0.61 b ¹	6.26 a	85.4 a	0.35 b
M2 (160 DDT)	0.68 ab	1.60 b	34.0 c	0.31 b
M3 (229 DDT)	0.78 a	1.34 b	60.9 b	0.43 a
<i>P</i> -valor ²	*	***	*	**
LSD _{0.05}	0.11	1.595	20.8	0.05

Actividad APX expresada como $\mu\text{mol ASA oxidado g}^{-1} \text{PF min}^{-1}$; actividad DHAR expresada como $\mu\text{mol DHA reducido g}^{-1} \text{PF min}^{-1}$; actividad MDHAR expresada como $\text{nmol NADH oxidado g}^{-1} \text{PF min}^{-1}$; actividad AO expresada como $\text{nmol ASA oxidado g}^{-1} \text{PF min}^{-1}$.

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

frutos de tomate bajo condiciones de estrés ambiental durante el tercer muestreo podría constituir una respuesta eficaz que evitaría la aparición de un importante daño oxidativo. Esto podría explicar la ausencia de variaciones en la producción comercial de tomates durante el ciclo productivo (Fig. 5.2). Sin embargo, la mínima regeneración del DHA bajo condiciones de estrés podría haber causado un cierto daño, como la degradación de carotenoides (licopeno y β -caroteno) y por tanto de la aparición de mancha solar y disminución de la calidad nutricional y comercial. Finalmente, a pesar de la mínima reducción del DHA a partir de las enzimas DHAR y MDHAR en el tercer muestreo, las concentraciones de ASA fueron similares a los tres muestreos realizados (Tabla 5.3). Aunque es necesaria más investigación al respecto, bajo condiciones de estrés ambiental la disminución en las actividades DHAR y MDHAR desencadenaría en la planta un mecanismo alternativo de respuesta donde se induciría la síntesis *de novo* de ASA a partir de sus precursores (D-glucosa-6P; Wheeler *et al.*, 1998). En nuestro trabajo, esta respuesta explicaría que en el tercer muestreo, a pesar del incremento en la actividad APX y la

disminución en las actividades DHAR y MDHAR, se mantengan constantes los niveles de ASA.

Finalmente, el aumento en la capacidad de detoxificación de ROS en la fracción exocárpica de los frutos de tomate cherry a los 229 DDT se comprueba al analizar diferentes ensayos de actividad antioxidante. En la Tabla 5.5, tanto el test de actividad antioxidante mediante el método FRAP como el test de efecto detoxificador de ROS mostraron sus máximos valores durante el tercer muestreo, coincidiendo con las condiciones más estresantes de temperatura y radiación solar dentro del invernadero parral. Recientemente, gran cantidad de trabajos están relacionando este tipo de ensayos con la calidad nutricional y beneficios para la salud de los diferentes productos agrícolas destinados al consumo humano (Gahler, 2003; Toor y Savage, 2005). En este estudio, la utilización de esta relación no sería adecuada ya que el aumento de la actividad antioxidante en el tercer muestreo según los tests realizados se debería principalmente al incremento de la oxidación del ASA por parte de la APX, como indicamos anteriormente, y no al aumento de compuestos antioxidantes, como el licopeno, que resulta esencial para evaluar la calidad nutricional de los frutos de tomate cherry.

Tabla 5.5. Ensayos de actividad antioxidante en la fracción exocárpica de los frutos de tomate cherry en tres estados diferentes del periodo de producción de frutos.

	FRAP ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PF)	DPPH (% g^{-1} PF)
M1 (85 DDT)	30.7 b ¹	42.2 c
M2 (160 DDT)	34.6 b	60.9 b
M3 (229 DDT)	44.6 a	82.6 a
<i>P</i> -valor ²	**	***
LSD _{0.05}	8.27	7.23

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

5.3.4. Conclusión.

En definitiva, en los frutos de tomate cherry sometidos a una temperatura máxima elevada y una fuerte radiación solar (Fig. 5.1) se produjo un aumento de la peroxidación de lípidos y una disminución en el contenido de carotenoides (como el licopeno) en la fracción exocárpica, a pesar de que la oxidación del ASA por la actividad APX incrementó bajo estas condiciones. Posiblemente, la regeneración inhibida del DHA por las enzimas DHAR y MDHAR en el ciclo ascorbato/glutation en este experimento resulte un paso clave para evitar la disminución en el contenido de antioxidantes y por tanto en la mejora o mantenimiento de la calidad nutricional de estos frutos bajo condiciones experimentales de estrés ambiental.

CAPÍTULO 6

METABOLISMO DE LA PROLINA EN EL EXOCARPO DE TOMATE CHERRY EN RELACIÓN A LA TEMPERATURA Y A LA RADIACIÓN SOLAR

6.1. INTRODUCCIÓN.

La temperatura y la radiación luminosa son las variables ambientales externas que pueden limitar severamente la productividad y la calidad nutricional de un cultivo (Kuznestov y Shevyakova, 1997; Adams *et al.*, 2001). Uno de los mecanismos de respuesta ante estas situaciones de estrés ambiental es la acumulación de solutos compatibles, como es el caso de la prolina (Hare *et al.*, 1999; Ruiz *et al.*, 2002; Rivero *et al.*, 2004; Claussen, 2005). La prolina juega un papel importante en la respuesta al estrés, ya que protege a la estructura de las proteínas contra la desnaturalización, estabiliza las membranas celulares mediante interacción con los fosfolípidos, actúa como detoxificador de radicales hidroxilo, y también puede ser usada como fuente de energía y de nitrógeno (Hare *et al.*, 1999; Claussen, 2005).

En las plantas superiores, la prolina puede ser sintetizada a partir de glutamato o de ornitina (Bryan, 1990). En la ruta biosintética en la que interviene el glutamato, la prolina está catalizada mediante una enzima bifuncional, la Δ^1 -pirrolin-5-carboxylato sintetasa (P5CS). Por otro lado, la principal enzima encargada de la síntesis de prolina a partir de ornitina es la ornitina aminotransferasa (OAT; Delauney y Verma, 1993). Además del proceso biosintético, la acumulación de la prolina depende también de su degradación, la cuál está catalizada por la enzima mitocondrial prolina deshidrogenasa (PDH; Hare *et al.*, 1999). Un incremento en la acumulación de prolina en plantas sometidas a estrés podría ser causado por: una degradación de proteínas (Becker y Fock, 1986), una inhibición de la síntesis proteica (Dhindsa y Cleland, 1975), un descenso en el transporte de amidas y aminoácidos a los sumideros (Tully *et al.*, 1979), o una inhibición del desarrollo foliar (Davies y van Volkenburg, 1983).

La acumulación de prolina en situaciones de estrés podría estar provocado por: (i) un incremento en la síntesis de prolina, inducido por un aumento en la actividad de la enzima P5CS y/o OAT (Sánchez *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 2002; Rivero *et al.*, 2004); (ii) una reducción en su degradación

debido a una menor actividad PDH (Ruiz *et al.* 2002; Rivero *et al.*, 2004; Claussen, 2005); (iii) una degradación de proteínas ricas en prolina e hidroxiprolina, una reducción en la síntesis de proteínas, o un descenso en el uso de prolina para la síntesis proteica (Chaitanya *et al.*, 2001; Claussen, 2005).

En algunos trabajos, se ha estudiado el efecto de las altas temperaturas sobre la acumulación de prolina en algunas especies vegetales. En algodón, la acumulación de proteínas solubles y de prolina en hojas se consideró como un componente de adaptación importante en la tolerancia al estrés por calor (Ashraf *et al.*, 1994). Similarmente, en plantas de cebada sometidas a temperaturas elevadas (42°C) también se registró un fuerte incremento en la acumulación de prolina (Georgieva *et al.*, 2003). Recientemente, Rivero *et al.* (2004) demostraron que, en plantas de tomate sometidas a condiciones de estrés por calor (35°C), se produjo un aumento significativo en el contenido de prolina en las hojas con respecto a la temperatura óptima de crecimiento (25°C). Esto fue debido principalmente a la inducción de las principales enzimas que participan en su síntesis (P5CS y OAT) así como a una inhibición de la enzima responsable de su degradación (PDH), causando una estimulación general de la maquinaria de resistencia al estrés en la planta. Sin embargo, no se han realizado estudios en relación al metabolismo de la prolina en frutos expuestos a condiciones de estrés abiótico.

Como ya hemos comentado en capítulos anteriores, las elevadas temperaturas y la fuerte radiación solar en el interior del invernadero puede desencadenar en los frutos de tomate cherry una situación de estrés oxidativo, debido a la generación de ROS. Como resultado se produce un aumento en la peroxidación de lípidos, medido como contenido en MDA y actividad LOX, que pueden desencadenar la muerte celular y posterior necrosis en los tejidos del fruto (Fu y Huang, 2001; Mittler, 2002). Por tanto, debe existir algún mecanismo que contribuya a la reducción en la formación de ROS, ya que no se produce esa necrosis celular en el fruto, pero sí una fisiopatía comúnmente conocida como mancha solar.

En el capítulo anterior, observamos bajo estas condiciones de estrés una inducción en los mecanismos de respuesta antioxidante en los frutos de tomate cherry, un incremento en la actividad antioxidante mediante dos ensayos (FRAP y DPPH) y en la actividad de las enzimas de el ciclo ascorbato/glutathione. En este estudio, se define a la fracción exocárpica de los frutos de tomate cherry como la zona más expuesta a las condiciones de estrés ambiental, más que en las demás fracciones del fruto (como el mesocarpo y el exocarpo), y la de mayor importancia en relación a la calidad nutricional de los tomates cherry. En base a estudios que demuestran que solutos osmoprotectores como la prolina son capaces de detoxificar ROS mediante la formación de un complejo estable con ellos, e inhibiendo así la peroxidación de lípidos (Hong *et al.*, 2000), el incremento en la síntesis de prolina podría aumentar la resistencia a estas condiciones de estrés en el fruto de tomate cherry.

Por tanto, el principal objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de las altas temperaturas y radiación solar sobre el metabolismo de la prolina en la fracción exocárpica del fruto de tomate cherry, para así determinar si esta ruta metabólica podría utilizarse para seleccionar o generar plantas más resistentes a estas condiciones de estrés.

6.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.2.1. Diseño experimental y condiciones de crecimiento.

Toda información relacionada con la descripción del área de ensayo y del invernadero experimental, la agronomía del cultivo, la caracterización microclimática y los muestreos de los frutos se encuentra bien detallada en el apartado 5.2.

6.2.2. Análisis vegetal.

6.2.2.1. Prolina.

La concentración de prolina libre se cuantificó según el procedimiento descrito en el apartado 3.2.6.5.

6.2.2.2. Metabolismo de la prolina.

Para la extracción y el ensayo de las actividades P5CS, OAT y PDH, la fracción exocárpica de los frutos de tomate cherry se homogenizó en un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, que contenía MgCl₂ 7 mM, KCl 0.6 M, EDTA 3 mM, 1 mM DTT y PVPP 5% (p/v). El homogenizado fue filtrado y centrifugado a 10.000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se usó para la determinación de las actividades P5CS, OAT y PDH.

El ensayo de la actividad P5CS se realizó de acuerdo con el método propuesto por Zhang *et al.* (1995). La mezcla de reacción (con un volumen final de 0.5 mL) contenía 50 mM L-glutamato, 20 mM Mg Cl₂, 10 mM ATP, 100 mM hidroxamato-HCl y 50 mM Tris. La reacción se inició por la adición de 0.5 mL del extracto enzimático. Después de 5 min de incubación a 37°C, la reacción se paró por la adición de 0.5 mL de una solución que contenía FeCl₃ 2.5% y ácido tricloroacético 6%, en 100 mL de 2.5 M ClH. La concentración de P se

determinó usando el método de verde malaquita (Geladopoulos *et al.*, 1991). Los resultados obtenidos se expresaron como $\mu\text{mol P mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$.

El ensayo de la actividad PDH se llevó a cabo mediante la reducción de NAD^+ a 340 nm ($\epsilon = 6.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía tampón 0.15 M $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-HCl}$ (pH 10.3), 15 mM L-prolina y 1.5 mM NAD^+ (Miller y Stewart, 1976). Los valores resultantes se expresaron como $\mu\text{mol NAD}^+$ reducido $\text{mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$.

La actividad OAT se ensayó siguiendo el método propuesto por Charest y Phan (1990), donde la mezcla de reacción contenía tampón 0.2 M Tris-KOH pH 8.0, 5 mM ornitina, 10 mM α -cetoglutarato y 0.25 mM NADH, todo en un volumen final de 2 mL. La actividad OAT se calculó siguiendo el descenso de la absorbancia a 340 nm ($\epsilon = 6.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) después del inicio de la reacción por la adición de 0.4 mL de extracto enzimático. Los resultados fueron expresados como nmol NADH oxidado $\text{mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$.

Todas las actividades enzimáticas se expresaron en función de la cantidad de sustrato oxidado o reducido ($\text{mg de proteína}^{-1} \text{ (min)}^{-1}$). La concentración de proteínas presente en el extracto enzimático se determinó mediante el método de Bradford (1976) usando BSA como estándar.

6.2.2.3. Cuantificación de aminoácidos y proteínas

Los aminoácidos y proteínas solubles se determinaron después de una homogenización de las fracciones del fruto en tampón 50 mM KH_2PO_4 pH 7.0 y posterior centrifugación a 10000 rpm durante 15 min. El sobrenadante resultante se usó para la determinación de los aminoácidos solubles mediante el método de la ninhidrina (Yemm y Cocking, 1955), frente a una curva patrón de glicina, donde el contenido en aminoácidos se expresó como $\text{mg glicina g}^{-1} \text{ PF}$. La cantidad de proteínas solubles se midió utilizando el reactivo de Bradford (Bradford, 1976) y se expresó como $\text{mg proteína g}^{-1} \text{ PF}$, usando BSA como estándar.

6.2.2.4. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias de los tres muestreos se compararon mediante el test de rango múltiple de Duncan (DMRT; $P < 0.05$). Además, las medias han sido comparadas mediante el test de diferencias significativas mínimas de Fisher (LSD). Los niveles de significación se han representado mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Por lo general, el aminoácido prolina se acumula en las plantas durante la adaptación a varios tipos de estrés ambiental como la sequía, salinidad, temperaturas extremas, intensidad de luz excesiva y deficiencia de nutrientes (Delauney y Verma, 1993; Hare *et al.*, 1999; Claussen, 2005). El aumento de la radiación solar y la temperatura al final de la cosecha en nuestro experimento podrían desencadenar una serie de mecanismos de defensa antioxidante contra el estrés, incluyendo la acumulación de solutos compatibles como la prolina (Rivero *et al.*, 2004). En la Tabla 6.1 se observa cómo el contenido de prolina en los tomates cherry aumentó en el tercer muestreo, sugiriendo nuevamente la presencia de estrés en los tejidos vegetales (Ruiz *et al.*, 2002; Claussen, 2005), y más específicamente bajo estrés lumínico y térmico por calor (Georgieva *et al.*, 2003; Rivero *et al.*, 2004). Además, es importante resaltar que el contenido más elevado de prolina se encontró en la fracción exocárpica, que como comentamos en el capítulo anterior también presentó la mayor peroxidación de lípidos en los frutos de tomate cherry. Esto sugiere que la zona superficial del fruto es más sensible al incremento en la temperatura y radiación solar producida en el interior del invernadero parral, resultando en la aparición de zonas decoloradas comúnmente conocidas como machas solares y que causan pérdidas dramáticas tanto a los productores como a los consumidores (Adegroye y Jolliffe, 1983).

La acumulación de prolina bajo condiciones de estrés se puede producir por la inducción o la activación de las enzimas de biosíntesis de la prolina (P5CS u OAT), por la reducción de la oxidación de prolina a glutamato (PDH), por un bajo uso de prolina en la síntesis de proteínas, o por un aumento de la degradación de proteínas (Delauney y Verma, 1993; Claussen, 2005). En general, la acumulación de prolina en respuesta a diversos tipos de estrés se correlaciona con la activación transcripcional de los genes que codifican la P5CS, enzima reguladora y limitante en esta ruta biosintética (Hayashi *et al.*, 2000). La Tabla 6.1 muestra que las actividades P5CS y OAT fueron más elevadas en el tercer muestro (229 DDT), coincidiendo con el aumento de la

temperatura y la radiación solar en el interior del invernadero (Fig. 5.1). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Rivero *et al.* (2004), que observaron una activación de ambas vías de síntesis, representada tanto por la enzima P5CS como por la OAT en las hojas de tomate sometidas a estrés por calor (35°C), usando condiciones muy similares a las del experimento actual. Sin embargo, bajo otros tipos de estrés se obtuvieron diferentes respuestas, inhibiéndose una de las rutas. Así, Sánchez *et al.* (2001) demostraron una reducción en la actividad P5CS y un incremento en la actividad OAT en plantas de judía bajo dosis de deficiencia y exceso de nitrógeno. Otros resultados similares fueron los obtenidos por Ruiz *et al.* (2002) en plantas de judía sometidas a un choque de frío, donde la actividad OAT aumentó significativamente y la actividad P5CS disminuyó.

Tabla 6.1. Contenido en prolina y actividad de las enzimas responsables de la síntesis de prolina (P5CS y OAT) y de su oxidación (PDH) en el exocarpo de tomate cherry en tres periodos productivos diferentes durante el ciclo de cultivo.

	Prolina	P5CS	OAT	PDH
M1 (85 DDT)	1.76 b ¹	23.8 b	0.26 b	25.8 b
M2 (160 DDT)	1.56 b	29.1 b	0.26 b	31.8 b
M3 (229 DDT)	2.39 a	50.8 a	0.58 a	53.8 a
<i>P</i> -valor ²	**	***	**	*
LSD _{0.05}	0.41	5.47	0.15	15.1

Contenido en prolina expresado como nmol g⁻¹ PF; actividad Δ^1 -pyrrolin-5-carboxilato syntetasa (P5CS) expresada como $\mu\text{mol P (mg proteína)}^{-1} (\text{min})^{-1}$; actividad ornithina- δ -aminotransferasa (OAT) expresada como nmol NADH oxidado $(\text{mg proteína})^{-1} (\text{min})^{-1}$; actividad prolina deshidrogenasa (PDH) expresada como $\mu\text{mol NAD(P)}^+$ reducido $(\text{mg proteína})^{-1} (\text{min})^{-1}$.

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

El metabolismo y la acumulación de prolina también depende de su degradación, catalizada por la enzima mitocondrial PDH, encargada de transformar la L-prolina a Δ^1 -pirrolin-5-carboxilato (P5C), transfiriendo los electrones y protones de la prolina a la cadena de transporte electrónico, incrementando un consumo de O_2 y una producción de H^+ hacia el espacio intermembrana mitocondrial (Delauney y Verma, 1993; Hare *et al.*, 1999). En general, ante ciertos tipos de estrés (principalmente deshidratación y estrés salino) se produce una inhibición drástica de la actividad PDH donde la prolina podría actuar como un compuesto osmorregulador (Claussen, 2005; Simon-Sarkadi *et al.*, 2005). Asimismo, en las hojas de plantas de tomate sometidas a estrés por calor (35°C), Rivero *et al.* (2004) observaron una fuerte reducción en la degradación de prolina mediante la inhibición de la enzima PDH. Por el contrario, en nuestro experimento se mostró una mayor actividad PDH durante el periodo de estrés (229 DDT) en los frutos de tomate cherry (Tabla 6.1).

En resumen, nuestros resultados indican que, en los tomates cherry sometidos a estrés lumínico y por calor a los 229 DDT, la síntesis de prolina y la degradación es continua, debido a la inducción de las dos enzimas responsables de la síntesis de prolina (P5CS y OAT) así como su degradación (PDH). La inducción de las dos vías de síntesis de prolina podría ser la causa principal de la acumulación de prolina al final del periodo de estudio. Por lo tanto, la degradación continua de la prolina mediante la PDH implicó un aumento del compuesto P5C, transfiriendo electrones hacia la cadena de transporte electrónica e induciendo el consumo de O_2 en la respiración (Nanjo *et al.*, 1999), lo cuál contribuiría considerablemente a un descenso en la formación de ROS. Así, este incremento en la actividad PDH podría actuar como un mecanismo eficaz de respuesta ante el estrés oxidativo, participando directamente en la detoxificación de O_2 y reduciendo la formación de ROS. Esto podría explicar la ausencia de necrosis celular en los frutos de tomate cherry y el mantenimiento de la producción durante el ciclo productivo de la planta.

Tabla 6.2. Contenido en aminoácidos totales y proteínas solubles en el exocarpo de tomate cherry en tres periodos productivos diferentes durante el ciclo de cultivo.

	Proteínas solubles (mg BSA g ⁻¹ PF)	Aminoácidos totales (mg Gly g ⁻¹ PF)
M1 (85 DDT)	1.89 a	2.21 b
M2 (160 DDT)	1.88 a	2.18 b
M3 (229 DDT)	1.58 b	2.53 a
<i>P</i> -valor ²	**	**
LSD _{0.05}	0.24	0.20

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

Como indicamos anteriormente, la acumulación de prolina podría ser debida a: un incremento en su síntesis, una disminución de su degradación, una menor utilización de la prolina en la síntesis de proteínas, o a una mayor degradación de proteínas (Delauney y Verma 1993; Claussen 2005). La Tabla 6.2 muestra un mayor contenido de aminoácidos en los tomates cherry recogidos durante el tercer muestreo, coincidiendo con una reducción en el contenido de proteínas solubles. Por lo tanto, en los frutos de tomate cherry a los 229 DDT, se observa una síntesis de proteínas reducida o una mayor hidrólisis a aminoácidos, la cuál podría contribuir en la acumulación de prolina bajo estas condiciones de estrés. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chaitanya *et al.* (2001), que describen en su estudio una disminución del contenido en proteínas solubles y un aumento en el de aminoácidos, así como en el contenido de prolina, en hojas de plantas de mora expuestas a altas temperaturas.

En conclusión, nuestros datos experimentales muestran que, a los 229 DDT, la fracción exocárpica los frutos de tomate cherry sometidos a una elevada temperatura y radiación solar sufrió un incremento en la peroxidación

de lípidos (ver apartado 5.3.2), y por lo tanto la existencia de un estrés oxidativo. Aunque es necesaria más investigación al respecto, demostramos que algunas de las funciones atribuidas a la prolina en hojas también ocurren en los frutos. Consecuentemente, los resultados de este estudio son novedosos dado que, bajo estas condiciones experimentales, la degradación de prolina por la actividad PDH podría considerarse como un mecanismo de resistencia al estrés gracias al consumo de O_2 en la respiración, reduciendo la formación de ROS y contribuyendo a la ausencia de muerte celular y necrosis en los frutos de tomate cherry. Esto podría restringir la acumulación masiva de ROS, evitando la necrosis y finalmente las pérdidas en la productividad. Finalmente, la fracción exocárpica, estando más expuesta a las condiciones de estrés ambiental, podría ser fundamental en la selección o desarrollo de plantas resistentes y así evitar la formación de mancha solar en los frutos de tomate.

CAPÍTULO 7

ACTIVIDADES SUCROLÍTICAS EN EL EXOCARPO DE TOMATE CHERRY EN RELACIÓN A LA TEMPERATURA Y A LA RADIACIÓN SOLAR

7.1. INTRODUCCIÓN.

El contenido en carbohidratos, principalmente de sacarosa, constituye un parámetro importante tanto en el rendimiento como en la calidad nutricional de muchos cultivos, incluyendo el tomate (Damon *et al.*, 1988), y también sirve como un índice fisiológico para caracterizar el estado de madurez de los frutos (Bargerth y Schröder, 1994). La sacarosa es el principal producto de la fotosíntesis en las plantas y la mayor forma en la que los carbohidratos se translocan desde las hojas hasta el resto de la planta, para abastecer de carbono y energía durante el crecimiento y el almacenaje (ap Rees, 1987). La sacarosa puede ser por sí misma una reserva importante en hojas, tallos, tubérculos y frutos, y puede también ayudar a proteger a las plantas de estreses ambientales como el frío y la sequía (Lunn y Furbank, 1999). En los últimos años, se ha reconocido que la sacarosa también actúa como un compuesto señal, comunicando información entre diferentes partes de la planta en relación al ambiente externo (Koch, 1996).

Generalmente, los frutos de tomate acumulan azúcares en forma de sacarosa o azúcares reductores (glucosa y fructosa), dependiendo de las condiciones ambientales y de la fase de crecimiento de la planta. Aunque la sacarosa es la forma primaria de azúcar translocada en las plantas de tomate, dos hexosas – glucosa y fructosa – se presentan en cantidades más o menos iguales en los frutos de tomate, mientras la concentración de sacarosa suele ser muy baja (glucosa 22%, fructosa 25% y sacarosa 1% del peso seco) (Walker y Ho, 1977; Davies y Hobson, 1981; Islam *et al.*, 1996).

Existen dos vías para la degradación de sacarosa que proporcionan la base para un sistema flexible que puede afectar marcadamente a la partición y metabolismo de los asimilados de carbono en los tejidos sumideros (Geiger *et al.*, 1996). La sacarosa sintasa localizada en el citoplasma cataliza una reacción reversible que degrada sacarosa y UDP a UDP-glucosa y fructosa, mientras que las invertasas ácida (apoplasto y vacuola) y neutra (citoplasma y vacuola) catalizan la hidrólisis de la sacarosa a glucosa y fructosa. Estas

actividades sucrolíticas sirven en los tejidos sumideros de las plantas como un paso primario de conversión de sacarosa hacia productos de almacenaje del sumidero, como el almidón, las proteínas y los aceites (Doehlert y Chourey, 1991; Balibrea *et al.*, 1996).

La fuerte intensidad lumínica y las elevadas temperaturas son dos variables ambientales externas que pueden limitar severamente tanto la productividad como la calidad nutricional de un cultivo (Kuznestov y Shevyakova, 1997; Adams *et al.*, 2001). Como ya hemos comentado anteriormente, estas condiciones adversas en el interior de los invernaderos pueden inducir un estrés oxidativo en los frutos de tomate cherry debido a la generación de ROS (Dumas *et al.*, 2003). Como resultado se produce una mayor peroxidación de lípidos, medida como contenido en MDA y actividad LOX, la cuál puede desencadenar la muerte celular y posterior necrosis en los tejidos del fruto (Fu y Huang, 2001; Mittler, 2002; Vranová *et al.*, 2002). Gracias a la obtención de una progresión de las respuestas al estrés, el estrés ambiental es un factor importante que afecta a la partición del carbono (Geiger *et al.*, 1996). Así, existe una escasa información disponible de cómo los efectos de la temperatura y la radiación solar influyen sobre la acumulación de carbohidratos en los frutos de tomate cherry. Sin embargo, se ha mostrado que la temperatura regula la acumulación de carbohidratos en tubérculos de patata (Lafta y Lorenzen, 1995) y en frutos de kiwi (Richardson *et al.*, 2004). Por tanto, considerando la relevancia económica y nutricional del cultivo de tomate, en este estudio evaluamos el impacto de la temperatura y la radiación solar sobre el contenido en azúcares solubles y las actividades sucrolíticas en los frutos de tomate cherry.

7.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

7.2.1. Diseño experimental y condiciones de crecimiento.

Toda información relacionada con la descripción del área de ensayo y del invernadero experimental, la agronomía del cultivo, la caracterización microclimática y los muestreos de los frutos se encuentra bien detallada en el apartado 5.2.

7.2.2. Análisis vegetal.

7.2.2.1. Determinación de azúcares.

Los contenidos en sacarosa, D-glucosa y D-fructosa se determinaron mediante el uso de ensayos enzimáticos comerciales (R-Biopharm, Francia), en los cuáles se midió la formación de NADPH a 340 nm, de acuerdo a lo descrito en el protocolo de cada ensayo. Los resultados fueron expresados como mg g^{-1} PF.

7.2.2.2. Determinación de almidón.

Para la determinación de almidón se utilizó el precipitado procedente de la centrifugación descrita en el apartado 3.2.6.5, y tras su desecación a 40°C durante 48 h se procedió a su cuantificación (Irigoyen *et al.*, 1992). Al tubo de ensayo con el residuo seco se le añadió 2.5 mL de H₂O desionizada, 2.5 mL de tampón acetato 4M (pH 4.5) y 2.5 mL de α -glucoamilasa al 0.5% (p/v). Tras su resuspensión, la mezcla de reacción se incubó en oscuridad durante 48 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo la solución se filtró y se utilizó para determinar el almidón. Para ello, se mezclaron 0.02 mL de extracto, 6 mL de reactivo de antrona (300 mg antrona + 300 mL H₂SO₄ 70%), se agitaron bien los tubos y se introdujeron en un baño de agua a 100°C durante 10 min. Posteriormente, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se volvieron a agitar vigorosamente. Finalmente, se registró la absorbancia a una longitud de onda

de 650 nm frente a una curva patrón de glucosa. Los resultados, y con el fin de determinar la concentración de almidón contenida en las muestras problema, se multiplicaron por un factor de 0.9, según indica Ettl (1981). Los resultados fueron expresados como mg glucosa g⁻¹ PF.

7.2.2.3. Determinación de las enzimas sucrolíticas.

La actividad de la **sacarosa sintasa** (EC 2.4.1.13) cataliza la reacción reversible: sacarosa + UDP ⇌ UDP-glucosa + fructosa. La extracción de la sacarosa sintasa se realizó homogenizando 1 g de tomate cherry en 5 mL de tampón HEPES-NaOH 50 mM a pH 7.5, el cuál contenía 5 mM MgCl₂, 1 mM Na-EDTA, 2.5 mM DTT, 0.5 mg mL⁻¹ BSA y Triton X-100 al 0.05% (v/v), de acuerdo con el método propuesto por Hubbard *et al.* (1989). El homogenizado se filtró y se centrifugó a 11500 rpm durante 10 min. El extracto resultante se usó para la determinación de la actividad enzimática y de las proteínas solubles, las cuáles fueron medidas siguiendo el método de Bradford (1976). La actividad sacarosa sintasa fue determinada en una mezcla de reacción que contenía 50 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 15 mM MgCl₂, 25 mM Fructosa, 25 mM UDP-Glucosa, y extracto vegetal, siguiendo el método realizado por Cheikh y Brenner (1992). El contenido en sacarosa se determinó según el método de antrona descrito en el apartado anterior (8.2.2.2), frente a una curva patrón de sacarosa, y los resultados se expresaron como mmol sacarosa mg⁻¹ proteína min⁻¹.

Las **invertasas** catalizan la reacción hidrolítica de la sacarosa originando glucosa y fructosa. Tanto la invertasa ácida (EC 3.2.1.26) como la neutra (EC 3.2.1.27) fueron extraídas mediante la homogenización de 1 g de tomate cherry en 5 mL de tampón fosfato potásico 0.2 M a pH 7.0 que contenía 20 mM mercaptoetanol, siguiendo el método de Hubbard *et al.* (1989). Para la determinación de la invertasa ácida se preparó una mezcla de reacción que contenía: 0.6 mL de tampón acetato sódico 0.1 M a pH 4.5, 0.2 mL de sacarosa 0.75 M y 0.02 mL de extracto enzimático. La mezcla de reacción se incubó en oscuridad a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo por adición de 1 mL de una solución que contenía: 1 g de ácido dinitrosalicílico, 0.1 g de fenol, 0.05 g de sulfito sódico y 1 g de NaOH, preparado de acuerdo al método de Miller

(1959). Las muestras se incubaron durante 5 min en un baño de agua a 100°C y se enfriaron a temperatura ambiente. Posteriormente, se le agregó 1 mL de Sal de Rochelle (tartrato sódico potásico tetrahidrato) al 40% y se leyó la absorbancia a 575 nm frente a una curva patrón de glucosa. Para la determinación de la invertasa neutra se siguió el mismo proceso que en la invertasa ácida, excepto que el tampón acetato sódico fue sustituido por tampón fosfato-citrato 0.1 M a pH 7.0 (Hubbard *et al.*, 1989). La actividad de ambas invertasas se expresó como $\mu\text{mol glucosa mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$.

7.2.2.4. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias de los tres muestreos se compararon mediante el test de rango múltiple de Duncan (DMRT; $P < 0.05$). Además, las medias han sido comparadas mediante el test de diferencias significativas mínimas de Fisher (LSD). Los niveles de significación se han representado mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Bajo condiciones de estrés ambiental, la generación de ROS puede dañar a las macromoléculas y finalmente a la estructura celular (Mittler, 2002; Vranová *et al.*, 2002). El análisis de la peroxidación de lípidos expresada como actividad LOX, concentración de H₂O₂ y contenido en MDA indica la prevalencia y activación de los ROS en los tejidos como consecuencia del estrés oxidativo (Fu y Huang, 2001). Bajo nuestras condiciones de estudio, encontramos un incremento significativo tanto en la peroxidación de lípidos como en las actividades antioxidantes en los frutos de tomate cherry durante el tercer muestreo (Tablas 5.2, 5.3 y 5.4), coincidiendo con los mayores valores de temperatura y radiación solar (Fig. 5.1). El aumento en la peroxidación de lípidos y las actividades antioxidantes a los 229 DDT indicaron un estrés oxidativo, provocado por las elevadas temperaturas e intensa radiación solar, los cuáles, aunque no produjeron un descenso en el producción (Fig. 5.2), provocaron desórdenes metabólicos y fisiológicos en los frutos, afectando a la calidad nutricional así como a la aceptabilidad en el mercado.

El contenido en azúcares de los frutos de tomate cherry es determinante tanto en el sabor como en la calidad nutricional (Peet, 1996). La Tabla 7.1 indica que la concentración de sacarosa en los frutos progresivamente disminuyó a lo largo del ciclo productivo, alcanzando los valores más bajos durante el tercer muestreo y coincidiendo con las condiciones de elevada temperatura y radiación solar (Fig. 5.1). En relación al contenido en glucosa y fructosa, se encontró un aumento progresivo durante el ciclo productivo (Tabla 7.1), siendo más pronunciado en los tomates recogidos al final de este periodo (229 DDT). Este descenso en la concentración de sacarosa e incremento en el contenido en glucosa, fructosa y en el cociente hexosas:sacarosa (Tabla 7.1) claramente indica una degradación de sacarosa, la cuál fue mucho más pronunciada en los frutos cosechados durante el tercer muestreo, coincidiendo con las condiciones de estrés ambiental.

Aunque el contenido en azúcares en los frutos de tomate cherry sometidos a estrés térmico y lumínico no ha sido casi estudiado, se ha observado que las plantas de tomate expuestas a salinidad acumularon más hexosas que las plantas control, mientras que la concentración de sacarosa se mantuvo similar en ambas situaciones (Gao *et al.*, 1998). Esto coincide con los resultados de este trabajo, donde mostramos que las condiciones de estrés sufridas durante el tercer muestreo producidas por el incremento en la temperatura y radiación solar llevaron a un incremento en los niveles de hexosas en los frutos de tomate cherry.

En adición, el almidón es uno de los principales carbohidratos producidos en las plantas superiores durante la fotosíntesis (ap Rees, 1987). Las triosas-fosfato no usadas para la síntesis de sacarosa son utilizadas para producir almidón, el cuál actúa como un reservorio de carbono (Medrano y Flexas, 2001). En nuestro experimento, encontramos que los tomates cherry muestreados al final del ciclo productivo del cultivo (229 DDT) registraron un aumento significativo en el contenido de almidón (Tabla 7.1). Esta acumulación de almidón bajo esta situación de estrés podría garantizar la transformación de la sacarosa importada al fruto, ya que mantiene un gradiente pasivo continuo de sacarosa para estimular el importe de carbohidratos hacia el fruto (Cuartero *et al.*, 1999). Si calculamos un cociente sacarosa:almidón, encontramos una reducción sustancial durante el periodo de producción, llegando este índice a ser más bajo en el tercer muestreo (Tabla 7.1). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sánchez *et al.* (2005), indicando en plantas de judía sometidas a deficiencia y toxicidad de N una disminución de este cociente en relación a condiciones de estrés. Consecuentemente, el bajo cociente sacarosa:almidón junto con el elevado cociente hexosas:sacarosa pueden ser considerados como indicadores de una situación de estrés por calor y por fuerte radiación solar en los frutos de tomate cherry.

Tabla 7.1. Contenido en azúcares en el exocarpo de los frutos de tomate cherry tres periodos productivos diferentes durante el ciclo de cultivo.

	Sacarosa (mg g ⁻¹ PF)	Glucosa (mg g ⁻¹ PF)	Fructosa (mg g ⁻¹ PF)	Hexosas:sacarosa	Almidón (mg glucosa g ⁻¹ PF)	Sacarosa:almidón
M1 (85 DDT)	4.93 a ¹	17.8 c	18.4 b	26.0 b	18.0 b	0.24 a
M2 (160 DDT)	2.54 b	24.5 b	21.2 b	51.4 b	17.7 b	0.13 b
M3 (229 DDT)	0.77 c	37.6 a	34.1 a	159.5 a	19.6 a	0.05 c
<i>P</i> -valor ²	***	***	***	***	***	***
LSD _{0.05}	1.67	5.84	5.68	43.1	0.72	0.06

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

La degradación de sacarosa se cataliza inicialmente tanto por la sacarosa sintasa como por las invertasas ácida y neutra (Balibrea *et al.*, 1996). En nuestro experimento, encontramos un incremento significativo en la actividad sacarosa sintasa en los frutos de tomate cherry muestreados al final del ciclo productivo (Tabla 7.2), coincidiendo con la reducción en el contenido de sacarosa y el incremento en los contenidos de glucosa y fructosa (Tabla 7.1), así como con los valores más elevados de temperatura y radiación solar (Fig. 5.1). En relación a la actividad de las invertasas, encontramos que tanto la actividad invertasa ácida como la neutra fueron ligeramente superiores en los frutos recogidos en el segundo muestreo (160 DDT), disminuyendo ambas actividades al final del periodo productivo (229 DDT; Tabla 7.2). Geiger *et al.* (1996) mostraron que la sacarosa sintasa predomina a menudo en los sumideros de almacenaje de almidón/sacarosa, mientras que las invertasas predominan donde existe una expansión celular activa. Por tanto, es de esperar que la actividad sacarosa sintasa debe tomar una mayor importancia en el almacenaje de sacarosa/almidón en los frutos de tomate. Sin embargo, bajo estas condiciones, el incremento en la actividad sacarosa sintasa induce la

Tabla 7.2. Enzimas sucrolíticas en el exocarpo de los frutos de tomate cherry tres periodos productivos diferentes durante el ciclo de cultivo.

	Sacarosa sintasa (mmol sacarosa mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)	Invertasa ácida (μmol glucosa mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)	Invertasa neutra (μmol glucosa mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)
M1 (85 DDT)	0.19 b ¹	21.2 ab	4.03 b
M2 (160 DDT)	0.18 b	23.5 a	6.03 a
M3 (229 DDT)	0.26 a	18.9 b	4.67 b
<i>P</i> -valor ²	***	**	***
LSD _{0.05}	0.02	2.67	0.81

¹Los valores con las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con DMRT a $P \leq 0.05$.

²Niveles de significación representados mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y NS, no significativo.

degradación de sacarosa a UDP-glucosa y fructosa, y la UDP-glucosa puede ser transformada en almidón (Ordoñez *et al.*, 2005), el cuál actúa como un reservorio de glucosa. En conclusión, nuestros resultados son similares a los obtenidos por Ordoñez *et al.* (2005), y así definimos a la sacarosa sintasa como la principal enzima responsable del aumento en la actividad sucrolítica en los frutos de tomate cherry bajo condiciones de estrés por calor y elevada radiación solar. Por lo tanto, la reducción en el contenido en sacarosa durante el segundo muestreo podría ser explicado también por el ligero incremento en la actividad de ambas invertasas (Tabla 7.2).

El incremento en la actividad sucrolítica producida por la sacarosa sintasa en los tomates cherry ante esta situación de estrés conlleva a una mayor formación de glucosa y fructosa, lo cuál podría favorecer los mecanismos de defensa antioxidante mediante el abastecimiento de precursores de compuestos antioxidantes, y evitar así la formación de desórdenes metabólicos y fisiológicos producidos por el incremento de la temperatura y la radiación solar al final del periodo productivo del cultivo. Así, en el capítulo 5 observamos cómo bajo estas mismas condiciones se produjo un incremento en la síntesis de ascorbato total en los frutos muestreados a los 229 DDT, desencadenándose un notable incremento de los mecanismos de respuesta antioxidante en los frutos de tomate cherry. Dado que la glucosa es el principal precursor del antioxidante ascorbato y de algunos pigmentos vegetales (como los carotenoides), y que la fructosa también interviene en la síntesis de antioxidantes (Carrari y Fernie, 2006), este incremento en la actividad sucrolítica producido principalmente por la sacarosa sintasa podría contribuir a los mecanismos de defensa antioxidante del fruto.

En conclusión, los frutos de tomate cherry sometidos a condiciones de elevadas temperaturas del aire y de radiación solar incrementó su actividad sucrolítica, inducido principalmente por un incremento de la actividad sacarosa sintasa, causando un aumento en el contenido de hexosas. Aunque más investigación al respecto es necesaria, este incremento en la degradación de sacarosa por la sacarosa sintasa ante una situación de estrés producido por elevadas temperaturas y radiación solar en los frutos de tomate cherry podría

contribuir de manera importante a los mecanismos de defensa antioxidante, mediante el abastecimiento de los principales precursores (glucosa y fructosa) de los compuestos antioxidantes. Esto restringiría la formación masiva de ROS y por tanto de necrosis celular, como hemos comprobado en capítulos previos, reduciendo así las pérdidas de producción, lo que podría ser fundamental en la selección o desarrollo de plantas resistentes a este tipo de estrés.

INTERPRETACIÓN DEL BLOQUE III

El clima mediterráneo se caracteriza principalmente por un aumento en las temperaturas y una fuerte radiación solar durante los meses de verano, lo que puede limitar de manera importante tanto la productividad como la calidad de los cultivos hortícolas (Adams *et al.*, 2001). A lo largo del periodo de estudio (ciclo de cultivo 2003-2004), las temperaturas máximas en el interior del invernadero parral mejorado alcanzaron sus valores más elevados (36°C) durante el tercer muestreo (229 DDT; Fig. 6.1), coincidiendo con un notable incremento en la radiación solar. A pesar de que estas condiciones ambientales podrían inducir la aparición de un estrés abiótico, en nuestro trabajo no observamos variaciones significativas en la producción comercial durante el periodo de estudio (Fig. 5.2), en contradicción a otros estudios realizados anteriormente donde se obtuvieron pérdidas de producción a partir de 26°C en las plantas de tomate (Rainwater *et al.*, 1996; Adams *et al.*, 2001). Sin embargo, aunque no se mostraron pérdidas significativas en la producción, en nuestro experimento se podrían haber desencadenado una serie de desórdenes metabólicos y fisiológicos, que podrían afectar significativamente a la calidad de los frutos de tomate cherry. De hecho, en este invernadero se observó durante este periodo de estrés la aparición de mancha solar en la mayoría de los frutos de tomate cherry. Para comprobar esta hipótesis, en este bloque hemos estudiado tres de los procesos que se definen por su importancia en las respuestas defensivas ante condiciones de estrés abiótico, como son: contenido en antioxidantes y metabolismo del ascorbato, metabolismo de la prolina y las actividades sucrolíticas.

Los carotenos son pigmentos muy importantes en la calidad nutricional de los frutos de tomate, siendo el licopeno el que representa la mayor proporción. Bajo estas condiciones elevadas de temperatura y radiación solar se produjo una reducción en el contenido en licopeno y β -caroteno (Tabla 5.1). La exposición de los frutos de tomate cherry a una intensa radiación solar podría inducir el sobrecalentamiento de su superficie (principalmente en el exocarpo), que junto con las condiciones de elevadas temperaturas (36°C) desencadenaría una inhibición en la síntesis de ambos carotenoides, induciendo así la formación de zonas de coloración defectiva comúnmente

conocidas como mancha solar. Además, se produjo un incremento en la peroxidación de lípidos durante el tercer muestreo (Tabla 5.2), lo que indica la posible existencia de un estrés oxidativo, que a pesar de no afectar a la producción comercial de los frutos, podría explicar la reducción del contenido en carotenos en el fruto, y por tanto la aparición de mancha solar.

Al estudiar la respuesta antioxidante observamos cómo durante el tercer muestreo, y coincidiendo con las condiciones de estrés por elevadas temperaturas y radiación solar, se produjo un incremento en la concentración de ascorbato total, debido principalmente al aumento en el contenido de DHA, mientras la forma reducida ASA permaneció constante en el exocarpo de tomate cherry durante todo el ciclo productivo (Tabla 5.3). La acumulación de DHA en el tercer muestreo coincidió con un incremento en la concentración de H_2O_2 en el exocarpo (Tabla 5.3). El incremento en la oxidación de ascorbato durante el tercer muestreo se explica claramente por el aumento en las actividades APX y AO, y por la disminución en la actividad DHAR durante este periodo (Tabla 5.4). Además, dos ensayos antioxidantes (FRAP y DPPH) mostraron sus máximos valores durante el tercer muestreo, coincidiendo con las condiciones más estresantes de temperatura y radiación solar dentro del invernadero tipo parral durante el primer ciclo de cultivo (Tabla 5.5). En definitiva, la oxidación aumentada de ASA por parte de la APX en la fracción exocárpica de frutos de tomate bajo condiciones de estrés ambiental durante el tercer muestreo podría constituir un mecanismo de respuesta antioxidante para evitar la aparición de un importante daño oxidativo.

Otro de los mecanismos de respuesta ante situaciones de estrés ambiental es la acumulación de solutos osmoprotectores como la prolina (Hare *et al.*, 1999). Durante el tercer muestreo, se observó un aumento en el contenido de prolina en el exocarpo de tomate cherry (Tabla 6.1). Además, también se produjo un incremento en la actividad de las enzimas de síntesis de prolina (P5CS y OAT; Tabla 6.2) y de la principal responsable de su degradación (PDH; Tabla 6.2). Por tanto, estos resultados indican que, en los tomates cherry sometidos a estrés lumínico y por calor durante el tercer muestreo, la síntesis de prolina y la degradación es continua. La inducción de

las dos vías de síntesis de prolina, junto con una síntesis de proteínas reducida o una mayor hidrólisis a aminoácidos (Tabla 6.3), podrían ser las principales responsables de la acumulación de prolina bajo estas condiciones de estrés. Por otro lado, la degradación continua de la prolina mediante la PDH implicó una transferencia de electrones hacia la cadena de transporte electrónica, induciendo el consumo de O_2 en la respiración, lo que contribuiría considerablemente a un descenso en la formación de ROS. Por tanto, este incremento en la actividad PDH podría actuar como un mecanismo eficaz de respuesta ante el estrés oxidativo, participando en la detoxificación de O_2 y reduciendo la formación de ROS.

Finalmente, el contenido en azúcares de los frutos de tomate cherry puede ayudar también a proteger a las plantas frente a varios estreses ambientales (Lunn y Furbank, 1999). A lo largo del ciclo productivo, se produjo una disminución en las concentraciones de sacarosa y un aumento de glucosa y fructosa en el exocarpo de tomate cherry (Tabla 7.1), alcanzando al final del periodo productivo los valores más elevados en el cociente hexosas:sacarosa (Tabla 7.1). Esto claramente indica un aumento en la degradación de sacarosa coincidiendo con estas condiciones de estrés por elevadas temperaturas y fuerte radiación solar. Además, durante el tercer muestreo también se observa un aumento en el contenido de almidón en el exocarpo (Tabla 7.1), el cuál bajo esta situación de estrés podría garantizar la transformación de la sacarosa importada al fruto, estimulando el importe de carbohidratos al fruto mediante un gradiente pasivo continuo de sacarosa (Cuartero *et al.*, 1999). También encontramos una reducción en el cociente sacarosa:almidón durante el tercer muestreo (Tabla 7.1), que junto al elevado cociente hexosas:sacarosa pueden ser considerados como indicadores de un estrés por calor y por fuerte radiación solar en los frutos de tomate cherry. Esta actividad sucrolítica se produjo principalmente por la sacarosa sintasa en el exocarpo durante el tercer muestreo (Tabla 7.2), mientras que las invertasas ácida y neutra no mostraron un incremento significativo en este muestreo (Tabla 7.2). Por tanto, nuestros resultados sugieren que el incremento en la actividad sucrolítica, inducido principalmente por la sacarosa sintasa, formaría parte los mecanismos de defensa antioxidante mediante el abastecimiento de precursores (glucosa y

fructosa) de compuestos antioxidantes para restringir la acumulación masiva de ROS y evitar la aparición de necrosis celular y reducir las pérdidas de producción.

En conclusión, bajo estas condiciones de estrés producido por un incremento en las temperaturas y una fuerte radiación solar, se desarrollaron varios mecanismos de resistencia. Uno de ellos, y probablemente el más importante, fue el aumento en la actividad antioxidante, producido por el incremento en el contenido de ASA y en su oxidación por la APX. Otro fue la acumulación de prolina y su continua degradación mediante la PDH, lo cuál podría considerarse como un mecanismo de resistencia al estrés por un aumento en el consumo de O₂. Finalmente, el tercer mecanismo se produjo gracias al aumento en la degradación de sacarosa por la sacarosa sintasa ante esta situación de estrés, lo que supondría un mayor abastecimiento de los principales precursores (como la glucosa y la fructosa) de compuestos antioxidantes.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo y su discusión se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. En general, los valores de producción total, comercial y no-comercial de tomates cherry no mostraron diferencias significativas entre los dos invernaderos durante los tres periodos de estudio. Sin embargo, es importante destacar que, por un lado, en el invernadero parral mejorado se produjo una reducción en la producción comercial durante el tercer muestreo, y que desde el punto de vista agronómico, en el invernadero multitúnel se originó una ganancia en la producción comercial de 23.6 t ha⁻¹, y por tanto un mayor beneficio económico.
2. En el invernadero parral mejorado (de bajo nivel tecnológico), se alcanzaron los valores más elevados de temperatura, radiación solar y DPV durante todo el ciclo productivo, lo cuál desencadenó unas mayores condiciones de estrés ambiental, definido por los valores más elevados de los indicadores de estrés estudiados y de respuesta antioxidante en los frutos de tomate cherry, lo que explicaría la reducción de la producción comercial producida en este invernadero al final del periodo productivo.
3. Las mayores condiciones de estrés ambiental en el invernadero parral mejorado desencadenaron una mayor calidad nutricional en los frutos de tomate cherry, definida por un mayor contenido en fenoles totales, flavonoides, antocianinas, ascorbato y una mayor capacidad antioxidante, no observándose diferencias significativas entre ambos invernaderos en cuanto al contenido en licopeno, β -caroteno, azúcares y ácidos orgánicos.
4. Durante el primer ciclo de cultivo se desarrollaron las mayores condiciones de estrés por calor y fuerte radiación solar en el invernadero parral mejorado, definidas por los valores más elevados de peroxidación de lípidos, principalmente en el exocarpo del tomate cherry, por ser la zona más expuesta a las condiciones ambientales externas. Por tanto, bajo

estas condiciones de estrés ambiental se desarrollaron los siguientes mecanismos de defensa:

- a) Un aumento en la actividad antioxidante, gracias al incremento en el contenido en ASA y en su oxidación por la actividad APX. Además, la acumulación de DHA producida por la inhibición de las enzimas DHAR y MDHAR en el ciclo ascorbato/glutathione en este experimento puede resultar un paso clave como indicador de condiciones de estrés ambiental, y por tanto en la mejora o mantenimiento de la calidad nutricional de estos frutos bajo estas condiciones adversas.
- b) Una acumulación de prolina y su continua degradación mediante la PDH, lo cuál podría considerarse como un mecanismo de resistencia al estrés por un aumento en el consumo de O₂.
- c) Un aumento en la degradación de sacarosa por la sacarosa sintasa ante esta situación de estrés, lo que supondría un mayor abastecimiento de los principales precursores (como la glucosa y la fructosa) de compuestos antioxidantes.

En definitiva, y en nuestra opinión, estos tres mecanismos de defensa podrían considerarse como herramientas útiles en la selección o desarrollo de plantas resistentes a este tipo de estrés, y así intentar evitar la formación de mancha solar en los frutos de tomate.

CAPÍTULO 9
BIBLIOGRAFÍA

- Adams P, Winsor G, 1987. Diagnosis of mineral disorders in plant. *Glasshouse Crops*. Ed.: Robinson JBD, University of Bristol, Reino Unido, p. 60-61.
- Adams SR, Cockshull KE, Cave CRJ, 2001. Effect of temperature on the growth and development of tomato fruits. *Ann. Bot.* 88, 869-877.
- Adamse P, Peters JL, Jaspers P, Van Tuinen A, Koorneef M, Kendrick RE, 1989. Photocontrol of anthocyanin synthesis in tomato seedling: a genetic approach. *Photochem. Photobiol.* 50, 107-111.
- Adegroye AS, Jolliffe PA, 1983. Initiation and control of sunscald injury of tomato fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108, 23-28.
- Alba R, Cordonnier-Pratt MM, Pratt LH, 2000. Fruit-localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. *Plant Physiol.* 123, 363-370.
- Ames BN, 1999. Micronutrient deficiencies. A major cause of DNA damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 889, 87-106.
- Amiot MJ, Tourniaire F, Margotat A, 2007. Flavonoids in food and wine. FAV Health 2005. QC, Canada. *Acta Hort.* 744, 107-116.
- Anon, 1978. *Nutritive Values of Fruit and Vegetables*. United Fresh Fruit and Vegetables Association, Alexandria, VA, EEUU.
- Anza M, Riga, P, Garbisu C, 2006. Effects of variety and growth season on the organoleptic and nutritional quality of hydroponically grown tomato. *J. Food Quality* 29, 16-37.
- ap Rees T, 1987. *Compartmentation of plant metabolism*. En: Davies, DD (Ed.), The biochemistry of plants, Vol 12 (Physiology of Metabolism). Academic Press, San Diego, CA, EEUU, pp. 87-115.
- Apel K, Hirt H, 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Rev. Plant Biol.* 55, 373-399.
- Asada K, 1994. *Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress*. En: Barber NR, Bowyer JR, Photoinhibition of Photosynthesis. Oxford: Biological Scientific Publishers, pp 129-142.
- Ashraf M, Saeed MM, Qureshi MJ, 1994. Tolerance to high temperature in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) at initial growth stages. *Environ. Exp. Bot.* 34, 275-283.
- Atherton JG, Rudich J, 1986. *The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement*. Chapman & Hall, New York, EEUU.
- Auerswald H, Drews M, Krumbein A, 1996. Der einfluss unterschiedlicher anbauverfahren auf merkmale der inneren qualitat von gewächshaustomaten im jahresverlauf. *Gartenbauwiss* 61, 77-83.

- Awad MA, Jager A, 2002. Relationships between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in 'Elstar' apple skin. *Sci. Hort.* 92, 265–276.
- Badiani M, De Bassi MG, Felici M, 1990. Soluble peroxidase from winter wheat seedlings with phenoloxidase-like activity. *Plant Physiol.* 93, 489-494.
- Bailey BJ, Richardson GM, 1990. A rational approach to greenhouse design. *Acta Hort.* 281, 111-117.
- Baldwin EA, Scott JW, Malundo TMM, Shewfelt RL, Tandom KS, 1998. Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavour. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123, 900-915.
- Balibrea ME, Santa-Cruz AM, Bolarín MC, Pérez-Alfocea F, 1996. Sucrolytic activities in relation to sink strength and carbohydrate composition in tomato fruit growing under salinity. *Plant Sci.* 118, 47-55.
- Bangerth F, Schroder M, 1994. Strong synergistic effects of gibberellins with the synthetic cytokinin n-(2-chloro-4-pyridyl)-n-phenylurea on parthenocarpic fruit-set and some other fruit characteristics of apple. *Plant Growth Regul.* 15, 293-302.
- Bartley GE, Scolnik PA, 1995. Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* 7, 1027-1038.
- Becker EM, Nissen LR, Skibsted LH, 2004. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *Eur. Food Res. Technol.* 219, 561-571.
- Becker TW, Fock HP, 1986. The activity of nitrate reductase and pool size of some amino acids and some sugars in water-stressed maize leaves. *Photosynthesis Res.* 8, 267-274.
- Benzie IEF, Strain JJ, 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Ann. Biochem.* 239, 70-76.
- Berninger E, 1989. *Cultures florales de serre en zone méditerranéenne française: Eléments climatiques et physiologiques*. INRA, PHM-Revue Horticole, Paris.
- Bertin N, Guichard S, Leonardi C, Longuenesse JJ, Langlois D, Navez B, 2000. Seasonal evolution of the quality of fresh glasshouse tomatoes under Mediterranean conditions, as affected by air vapour pressure deficit and plant fruit load. *Ann. Bot.* 85, 741-750.
- Beutner S, Bloedorn B, Frixel S, Blanco IH, Hoffman T, Martin H, et al., 2001. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of β -carotene in antioxidant functions. *J. Sci. Food Agric.* 81, 559-568.
- Beyer WF, Fridovitch I, 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem.* 161, 559-566.

- Bilton R, Gerber M, Grolier P, Leoni C, 2001. *The white book on antioxidants in tomatoes and tomato products and their health benefits*. Final report of the Concerted Action Fair CT97-3233. CMITI Sarl: Avignon, Francia.
- Blasco B, Rios JJ, Cervilla LM, Sánchez-Rodríguez E, Ruiz JM, Romero L, 2008. Iodine biofortification and antioxidant capacity of lettuce: potential benefits for cultivation and human health. *Ann. Appl. Biol.* (en prensa, 10.1111/j.1744-7348.2008.00217.x).
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV, 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 91, 179-194.
- Blum A, Ebercon A, 1976. Genotypic responses in sorghum to drought stress. 3. Free proline accumulation and drought resistance. *Crop Sci.* 16, 428-431.
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG, 1995. Adaptation to environmental stress. *Plant Cell* 7, 1099-1111.
- Bot GPA, 2003. The solar greenhouse; technology for low energy consumption. *Acta Hort.* 611, 61-69.
- Bowler C, Van Montagu M, Inze D, 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83-116.
- Boyer JS, 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218, 443-448.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brennan T, Frenkel C, 1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiol.* 59, 411-416.
- Bryan JK, 1990. The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise. En: *Intermediary Nitrogen Metabolism*. (Miflin BJ, Jea PJ, Eds). Academic Press, San Diego, EEUU. Vol. 16, 161-195.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plants Physiologist, Rockville, Maryland, EEUU, p. 1189- 1197.
- Buettner GR, Jurkiewicz BA, 1996. En: Cadenas E, Packer L (Eds), *Handbook of Antioxidants*. Marcel Dekker, New York, EEUU, p. 91.
- C.P.A. (Comité des Plastiques en Agriculture), 1992. *Les plastiques en agriculture*. CPA, París, Francia, p. 581.
- Cadahía C, 2005. *Fertirrigación: cultivos hortícolas, frutales y ornamentales*. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Cai Y, Luo M, Sun HC, Corke H, 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medical plants associated with anticancer. *Life Sci.* 74, 2157-2184.

- Carrari F, Fernie AR, 2006. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *J. Exp. Bot.* 57, 1883-1897.
- Castilla N, 2004. *El cultivo protegido*. En: Invernaderos de plástico. Manejo y tecnología. Mundi-Prensa, España, pp 25-35.
- Castilla N, Hernández J, Abou-Hadid AF, 2004. Strategic crop and greenhouse management in mild winter climate areas. ISHS International Horticultural Congress. Symposium-16. Toronto, Canadá. *Acta Hort.* 633, 183-186.
- Castilla N, Lopez-Galvez J, 1994. Vegetable crop responses in improved low-cost plastic greenhouses. *J. Hort. Sci.* 69, 915-921.
- Cervilla LM, Blasco B, Ríos JJ, Romero L, Ruiz JM, 2007. Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. *Ann. Bot.* 100, 747-756.
- Chaitanya KV, Sundar D, Ramachandra-Reddy A, 2001. Mulberry leaf metabolism under high temperature stress. *Biol. Plant.* 44, 379-384.
- Charest C, Phan CT, 1990. Cold acclimation of wheat: Properties of enzymes involved in proline metabolism. *Physiol. Plant.* 80, 159-168.
- Cheikh N, Brenner ML, 1992. Regulation of key enzymes of sucrose biosynthesis in soybean leaves. *Plant Physiol.* 100, 1230-1237.
- Claussen W, 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Sci.* 168:241-248.
- Commenges D, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, Barberger-Gateau P, Dartigues JF, 2000. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur. J. Epidemiol.* 16, 357-363.
- Conklin PL, Barth C, 2004. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant Cell Environ.* 27, 959-970.
- Couée I, Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A, 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 57, 449-459.
- Cox SE, Stushnoff C, Sampson DA, 2003. Relationship of fruit color and light exposure to lycopene content and antioxidant properties of tomato. *Can. J. Plant Sci.* 83, 913-919.
- Cuartero J, Fernández-Muñoz R, 1999. Tomato and salinity. *Sci. Hortic.* 78, 83-125.
- Damon S, Hewitt J, Nieder M, Bennett AB, 1988. Sink metabolism in tomato fruit. *Plant Physiol.* 87, 731-736.
- Davey MW, Van Montagu M, Inzé D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie IJJ, Strain JJ, Favell D, Fletcher J, 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function,

- metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.* 80, 825-860.
- Davies JN, Hobson GE, 1981. The constituents of tomato fruit – the influence of environment, nutrition, and genotype. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15, 205-280.
- Davies WJ, van Volkenburg E, 1983. The influence of water deficit on the factors controlling the daily pattern of growth of *Phaseolus trifoliate*s. *J. Exp. Bot.* 34, 987-999.
- De Bryun JW, Garretsen F, Kooistra E, 1971. Variation in taste and chemical composition of the tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Euphytica* 20, 214-227.
- Delauney AJ, Verma DPS, 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4, 215-223.
- Dhindsa RS, Cleland RB, 1975. Water stress and protein synthesis. *Plant Physiol.* 55, 781-788.
- Dixon RA, Paiva NL, 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097.
- Doehlert DC, Chourey PS, 1991. *Possible roles of sucrose synthase in sink function*. En: Bonnemain JL, Delrot S, Lucas WJ, Dainty J (Eds.), *Recent Advances in Phloem Transport and Assimilate compartmentation*. Oest Editions, Nantes, Francia, pp. 187-195.
- Dorais M, 2007. Effect of cultural management on tomato fruit health qualities. FAV Health (2005). QC, Canada. *Acta Hort.* 744, 279–293.
- Dorais M, Ehret DL, Papadopoulos AP, 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochem. Rev.* (en prensa, 10.1007/s11101-007-9085-x)
- Dorais M, Papadopoulos AP, Gosselin A, 2001. Greenhouse tomato fruit quality: the influence of environmental and cultural factors. *Hort. Rev.* 26, 239–319.
- Dumas Y, Dadomo M, Di Lucca G, Grolier P, 2003. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *J. Sci. Food Agric.* 83, 369-382.
- Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JAM, 2000. Plant polyphenols in cancer and heart disease: Implications as nutritional antioxidants. *Nutr. Res. Rev.* 13, 79-106.
- Egert M, Tevini, M, 2002. Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environ. Exp. Bot.* 48, 43-49.
- Eichholzer M, Luthy J, Gutzwiller F, Stahelin HB, 2001. The role of folate, antioxidant vitamins and other constituents in fruit and vegetables in the prevention of

- cardiovascular disease: the epidemiological evidence. *Intl. J. Vitamin Nutr. Res.* 71, 5-17.
- Elstner EF, Oswald W, 1994. Mechanism of oxygen activation during plant stress. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh* 102B, 131-154.
- Elstner EF, 1987. *Metabolism of activated oxygen species*. En: Davies DD, *Biochemistry of plants*, Vol. 11. Academic Press, Londres, Reino Unido, p. 253-315.
- Ettel W, 1981. Eine neue enzymatische Stärkebestimmung für Lebensmittel. *Alimenta* 20, 7-11.
- FAO, 2004. Crop Description and Climate. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/agl/aglw/cropwater/tomato.stm#descrip> [24 Enero 2005].
- FAOSTAT, 2006. Disponible: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567> [30 Octubre 2007].
- Foyer CH, Descouvières P, Kunert KJ 1994. Protection against oxygen radicals: An important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17, 507-523.
- Foyer CH, Dujardyn M and Lemoine Y, 1989. Responses of photosynthesis and the xanthophyll and ascorbate–glutathione cycle to changes in irradiances, photoinhibition and recovery. *Plant Physiol. Biochem.* 27:751–60.
- Foyer CH, Mullineaux PM, 1994. *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. Boca Raton, CRC Press.
- Foyer CH, Noctor G, 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 28:1056-1071.
- Fu J, Huang B, 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environ. Exp. Bot.* 45, 105-114.
- Gahler S, Otto K, Bohm V, 2003. Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7962-7968.
- Gao Z, Sagi M, Lips SH, 1998. Carbohydrate metabolism in leaves and assimilate partitioning in fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) as affected by salinity. *Plant Sci.* 135, 149-159.
- García-Alonso M, Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC, 2004. Evaluations of the antioxidant properties of fruits. *Food Chem.* 84, 13-18.
- García-Closas R, Berenguer A, Tormo MJ, Sánchez MJ, Quirós JR, Navarro C, Arnaud R, Dorronsoro M, Chirlaque MD, Barricarte A, Ardanaz E, Amiano P, Martínez C,

- Agudo A, González CA, 2004. Dietary sources of vitamin C, vitamin E and specific carotenoids in Spain. *British J. Nutr.* 91, 1005-1011.
- García-Pineda E, Castro-Mercado E, Lozoya-Gloria E, 2004. Gene expression and enzyme activity of pepper (*Capsicum annum* L.) ascorbate oxidase during elicitor and wounding stress. *Plant Sci.* 166, 237-243.
- Garnaud JC, 1987. A survey of the development of plasticulture: Questions to be answered. *Plasticulture* 74, 5-14.
- Gautier H, Rocci A, Buret M, Grasselly D, Causse M, 2005. Fruit load or fruit position alters response to temperature and subsequently cherry tomato quality. *J. Sci. Food Agric.* 85, 1009-1016.
- Gautier H, Rocci A, Buret M, Grasselly D, Dumas Y, Causse M, 2004. Effect of photoselective filters on the physical and chemical traits of vine-ripened tomato fruits. *Can. J. Plant Sci.* 85, 439-446.
- Gautier H, Diakou-Verdin V, Bénard C, Reich M, Buret M, Bourgaud F, Poëssel JL, Caris-Veyrat C, Génard M, 2008. How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance? *J. Agric. Food Chem.* 56, 1241-1250.
- Geiger DR, Koch KE, Shieh WJ, 1996. Effect of environmental factors on whole plant assimilate partitioning and associated gene expression. *J. Exp. Bot.* 47, 1229-1238.
- Geladopoulos TP, Sotiroudis TG, Evangelopoulos AE, 1991. A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Anal. Biochem.* 192, 112-116.
- George B, Kaur C, Khurdiya DS and Kapoor HC, 2004. Antioxidants in tomato (*Lycopersicon esculentum*) as a function of genotype. *Food Chem.* 84:45-51.
- Georgieva K, Fedina I, Maslenkova L and Peeva V, 2003. Response of chlorina barley mutants to heat stress under low and high light. *Funct. Plant Biol.* 30, 515-524.
- Giannopolitis CN, Ries SK, 1977. Superoxide dismutase occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309-314.
- Giliberto L, Perrotta G, Pallara P, Weller JL, Fraser PD, Bramley PM, Fiore A, Tavazza M, Giuliano G, 2005. Manipulation of the blue light photoreceptor cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant content. *Plant Physiol.* 137, 199-208.
- Giovanucci E, Ascherio A, Rimm EB, Meir J, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, 1995. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 1767-1776.
- Giuntini D, Graziani G, Lercari B, Fogliano V, Soldatini GF, Ranieri A, 2005. Changes in carotenoid and ascorbic acid contents in fruits of different tomato genotypes related to the depletion of UV-B radiation. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3174-3181.

- González M, Miglioranza KSB, Aizpún de Moreno JE, Moreno VJ, 2005. Evaluation of conventionally and organically produced vegetables for high lipophilic organochlorine pesticide (OCP) residues. *Food Chem. Toxicol.* 43, 261–269.
- Gossett DR, Millhollon EP, Lucas MC, 1994. Antioxidant responses to NaCl stress in salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Sci.* 34, 706-714.
- Green MA, Fry SC, 2005. Degradation of vitamin C in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-1-threonate. *Nature* 433, 83-87.
- Gruda N, 2005. Impact of environmental factors on product quality of greenhouse vegetables for fresh consumption. *Critical Rev. Plant Sci.* 24, 227-247.
- Guichard S, Gary C, Longuenesse JJ, Leonardi C, 1999. Water fluxes and growth of greenhouse tomato fruits under summer conditions. *Acta Hort.* 507, 223–230.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.
- Hamazu Y, Chachin K, Ueda Y, 1998. Effect of post-harvest storage temperature on the conversion of C-14-mevalonic acid to carotenes in tomato fruit. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 67, 549-555.
- Hamazu Y, Miyamoto Y, Chachin K, 1994. Effect of high-temperatures on the change of carotenoid contents in tomato fruit after harvest. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 63, 675-684.
- Harborne JB, Williams CA, 2000. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochem.* 55, 481-504.
- Hare PD, Cress WA, van Staden J, 1999. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *J. Exp. Bot.* 50, 413-434.
- Hayashi F, Ichino T, Osanai M, Wada K, 2000. Oscillation and regulation of proline content by P5CS and ProDH gene expression in light/dark cycles in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell Physiol.* 41, 1096-1101.
- Heuvelink E, Dorais M, 2005. *Crop growth and yield*. En: Heuvelink E (ed) Tomato. Crop production science in horticulture series, no. 13. CAB International, Wallingford, Oxon, Reino Unido.
- Hicklenton PR, 1988. CO₂ enrichment in the greenhouse. *Growers Handbook Series 2*, p. 58.
- Hong Y, Kwon S, Chun M, Sernetz M, 1982. Immobilization of beta-galactosidase from *Escherichia coli* CSH36 and its microbial cells using cellulose beads. *Enzyme Eng.* 6, 217- 218.
- Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, Verma DPS, 2000. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* 122, 1129-1136.

- Hsu CL, Chen W, Weng YM, Tseng CY, 2003. Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. *Food Chem.* 83, 85–92.
- Huang J, Hiriri R, Adam L, Rozwadowski KL, Hammerlindl JK, Gage DA, Hanson AD, 2000. The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol.* 122, 747-756.
- Hubbard NL, Huber SC, Pharr DM, 1989. Sucrose phosphate synthase and acid invertase as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits. *Plant Physiol.* 91, 1527-1534.
- Hyson D, 2002. *The health benefits of fruits and vegetables*. A scientific overview for health professionals. Better Health Foundation, Wilmington, EEUU.
- Idso SB, Idso KE, 2001. Effects of atmospheric CO₂ enrichment on plant constituents related to animal and human health. *Environ. Exp. Bot.* 45, 179–199.
- Idso SB, Kimball BA, Shaw PE, Widmer W, Vanderslice JT, Higgs DJ, Montanari A, Clark WD, 2002. The effect of elevated atmospheric CO₂ on the vitamin C concentration of (sour) orange juice. *Agric. Ecosyst. Environ.* 90, 1–7.
- Inzé D, van Montagu M, 1995. Oxidative stress in plants. *Curr. Opinion Biotech.* 6, 153-158.
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sánchez-Díaz M, 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.* 84. 55-60.
- Islam MS, Matsui T, Yoshida Y, 1996. Carbohydrate content and the activities of sucrose synthase, sucrose phosphate synthase and acid invertase in different tomato cultivars during fruit development. *Sci. Hortic.* 65, 125-136.
- Jarret RL, Sayama H, Tigchelaar EC, 1984. Pleiotropic effects associated with the chlorophyll intensifier mutations high pigment and dark green in tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109, 873-878.
- Jen JJ, 1974. Influence of spectral quality of light on pigment systems of ripening tomatoes. *J. Food Sci.* 39, 907–910.
- Jin YH, Tao DL, Hao ZQ, Ye J, Du YJ, Liu HL, Zhou YB, 2003. Environmental stresses and redox status of ascorbate. *Acta Bot. Sin.* 45, 795-801.
- Johnson G, Schaal LA, 1957. Chlorogenic acid and other orthodihydrophenols on scab-resistant russet burbank and scab-susceptible triumph potato tubers of different maturities. *Phytopathol.* 47, 253-255.
- Johnson MK, Johnson EJ, MacElroy RD, Speer HL, Bruff BS, 1968. Effects of salts on the halophytic alga *Dunaliella viridis*. *J. Bacteriol.* 95, 1461-1468

- Jones CM, Mes P, Myers JR, 2003. Characterization and inheritance of the anthocyanin fruit (Aft) tomato. *J. Hered.* 94, 449-456.
- Jones JB, 1999. *Tomato Plant Culture: In the Field, Greenhouse and Home Garden.* CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, EEUU.
- Joy RW, Patel KR, Thorpe TA, 1988. AsA enhancement of organogenesis in tobacco callus. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* 13, 219-228.
- Ju Z, Duan Y, Ju Z, 1999. Effects of covering the orchard floor with reflecting films on pigment accumulation and fruit coloration in 'Fuji' apples. *Sci. Hortic.* 82, 47–56.
- Kalir A, Omri G, Poljakoff-Mayber A, 1984. Peroxidase and catalase activity in leaves of *Halimione portulacoides* L. exposed to salinity. *Physiol. Plant.* 62, 238-244.
- Karpinski S, Wingsle G, Karpinska B, Hallgreen JE, 1993. Molecular responses to photooxidative stress in *Pinus sylvestris* (L) .2. Differential expression of CuZn-superoxide dismutases and glutathione-reductase. *Plant Physiol.* 103, 1385-1391.
- Kerckhoffs LHJ, Kendrick RE, Whitelam GC, Smith H, 1992. Extension growth and anthocyanin responses of photomorphogenic tomato mutants to changes in the phytochrome photoequilibrium during the daily photoperiod. *Photochem. Photobiol.* 56, 611–615.
- Kerk NM, Feldman LJ, 1995. A biochemical model for initiation and maintenance of the quiescent centre: implications for organization of root meristems. *Plant Develop.* 121, 2825-2833.
- Keutgen AJ, Pawelzik E, 2008. Quality and nutritional value of strawberry fruit under long term salt stress. *Food Chem.* 107, 1413-1420.
- Kim D, Jeong SW, Lee CY, 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* 81, 321-326.
- Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A, 2002. Flavonoid intake and risk of chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 560-568.
- Koca H, Bor M, Ozdemir F, I Türkan, 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 60, 344-351.
- Koch KE, 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 509-540.
- Koskitalo LN, Ormrod DP, 1972. Effects of sub-optimal ripening temperatures on the colour quality and pigment composition of tomato fruit. *J. Food Sci.* 37, 56–59.
- Krumbein A, Schwarz D, Kläring HP, 2006. Effects of environmental factors on carotenoid content in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) grown in a greenhouse. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 80, 160–164.

- Kuznestov VV, Shevyakova NI, 1997. Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. *Proline Accumul. Phosphoryl. Polypept.* 100, 320-326.
- La Vecchia C, 1998. Mediterranean epidemiological evidence on tomatoes and the prevention of digestive tract cancers. *Proceed. Soc. Exp. Biol. Med.* 218, 125-128.
- Lafta AM, Lorenzen JH, 1995. Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. *Plant Physiol.* 109, 637-643.
- Lancaster JE, 1992. Regulation of skin colour in apples: a review. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10, 487-502.
- Lange H, Shropshire W, Mohr H, 1971. An analysis of phytochrome-mediated anthocyanin synthesis. *Plant Physiol.* 47, 649-655.
- Larsen HR, 1997. Vitamin C: your ultimate health insurance. *Intl. J. Alt. Complementary Med.* 15, 22-24.
- Lee KS, Kader AA, 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Technol.* 20, 207-220.
- Lee MT, Chen BH, 2002. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chem.* 78, 425-432.
- Leonardi C, Guichard S, Bertin N, 2000. High vapour pressure deficit influences growth, transpiration and quality of tomato fruits. *Sci. Hort.* 84, 285-296.
- Lester GE, 2006. Environmental regulation of human health nutrients (ascorbic acid, carotene, and folic acid) in fruits and vegetables. *HortScience* 41, 59-64.
- Levander OA, 1990. Fruit and vegetable contributions to dietary mineral intake in human health and disease. *HortSci.* 25, 1486-1488.
- Levitt J, 1980. Responses of plants to environment stress, Volumen 1: Chilling, freezing and high temperature stress. Academic Press, New York, EEUU.
- Levy J, Bosin E, Feldman B, Giat Y, Miinster A, Danilenko M, Sharoni Y, 1995. Lycopene is more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either a- or b-carotene. *Nutr. Cancer* 24, 257-267.
- Liu JR, Xie XR, Du JX, Sun JX, Bai XM, 2008. Effects of simultaneous drought and heat stress on Kentucky bluegrass. *Sci. Hort.* 115, 190-195.
- Lunn JE, Furbank RT, 1999. Sucrose biosynthesis in C₄ plants. *New Phytol.* 143, 221-237.
- Luthria DL, Mukhopadhyay S, Krizek DT, 2006. Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *J. Food Compos. Anal.* 19, 771-777.
- Madan S, Watee HSN, Jain RK, Chowdhury JB, 1995. Proline and proline metabolising enzymes in in-vivo selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. *Ann. Bot.* 76, 51-57.

- Manning JW, Tiedemann A, 1995. Climate change: potential effects of increased atmospheric carbon dioxide (CO₂), ozone (O₃), and ultraviolet-B (UV-B) radiation on plant diseases. *Environ. Pollut.* 88, 219–245.
- MAPA, 1989. *Caracterización agroclimática de la provincia de Granada*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, España, p. 197.
- Maroto JV, 1995. *Horticultura herbácea especial*. 4ª edición. Mundiprensa, Madrid, pp 714-775.
- Martinez S, Valek L, Resetic J, Ruzic DF, 2006. Cyclic voltammetry study of plasma antioxidant capacity - Comparison with the DPPH and TAS spectrophotometric methods. *J. Electroanal. Chem.* 558, 68-73.
- Mayne ST, 1996. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FABSEB J.* 10, 690-701.
- McCollum JP, 1954. Effects of light on the formation of carotenoids in tomato fruit. *Food Res.* 19, 182–189.
- Medrano H, Flexas J, 2001. *Fijación del dióxido de carbono y biosíntesis de fotoasimilados*. En: Azcón-Bieto J, Talón M (Eds), *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España, pp 173-185.
- Meir S, Kanner J, Akiri B, Hadas SP, 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1813-817.
- Ménard C, Dorais M, Hovi T, Gosselin A, 2006. Developmental and physiological responses of tomato and cucumber to additional blue light. *Acta Hort.* 711, 291–294.
- Mencarelli F, Salveit ME, 1988. Ripening of mature-green tomato fruit slices. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113, 742-745.
- Merzlyak MN, Chivkunova OB, 2000. Light-stress-induced pigment changes and evidence for anthocyanin photoprotection in apples. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 55, 155-163.
- Merzlyak MN, Solovchenko AE, Chivkunova OB, 2002. Patterns of pigment changes in apple fruits during adaptation to high sunlight and sunscald development. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 679–684.
- Miller GL, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Miller PM, Stewart CR, 1976. Pyrroline-5-carboxylic acid reductase from soybean leaves. *Phytochem.* 15, 1855-1857.

- Minguez-Mosquera MI, Jaren-Galen M, Garrido-Fernandez J, 1993. Lipoxygenase activity during pepper ripening and processing of paprika. *Phytochem.* 32, 1103-1108.
- Mittler R, 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410.
- Miyake C, Asada K, 1992. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach-chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol.* 33, 541-53.
- Mol J, Jenkins G, Schafer E, Weiss D, 1996. Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 525-557.
- Mukherjee SP, Choudhuri MA, 1983. Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiol. Plant.* 58, 166-170.
- Naczek M, Shahidi F, 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 1523-1542.
- Nagata M, Yamashita I, 1992. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 39, 925-928.
- Nanjo T, Kobayashi M, Yoshida Y, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, 1999. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 461, 205-210.
- Navas P, Gomez-Diaz C, 1995. Ascorbate free radical and its role in growth control. *Protoplasma* 184, 8-13.
- Nederhoff EM, 1994. Effects of CO₂ concentration on photosynthesis, transpiration and production of greenhouse fruit vegetable crops. Dissertation, Wageningen, The Netherlands.
- Nelson PV, 1985. *Greenhouse operation and management*. Prentice Hall, New Jersey, EEUU.
- Nguyen ML, Schwartz SJ, 1999. Lycopene: chemical and biological properties. *Food Technol.* 53, 38-45.
- Ninu L, Ahmad M, Miarelli C, Cashmore AR, Giullano G, 1999. Cryptochrome 1 controls tomato development in response to blue light. *Plant J.* 18, 551-556.
- Nkondjock A, Ghadirian P, 2004. Dietary carotenoids and risk of colon cancer: Case-control study. *Intl. J. Cancer* 110, 110-116.
- Noctor G, Foyer CH, 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249-279.

- Nuez FY, 1995. *El cultivo del tomate. Manejo del cultivo intensivo con suelo*. Mundi-Prensa, Madrid, España, p. 190-224.
- Ordoñez RM, Vattuone MA, Isla MI, 2005. Changes in carbohydrate content and related enzyme activity during *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn. fruit maturation. *Postharvest Biol. Technol.* 35, 293-301.
- Oshima S, Ojima F, Sakamoto H, Ishigura Y, Terao J, 1996. Supplementation with carotenoids inhibits singlet oxygen-mediated oxidation of human plasma low-density lipoprotein. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2306-2309.
- Özçelik N, Akilli M, 1999. Effects of CO₂ enrichment on vegetable growth, yield and quality of greenhouse grown tomatoes in soil and soilless cultures. *Acta Hort.* 486, 155-160.
- Pan J, Vicente AR, Martinez GA, Chaves AR, Civello PM, 2004. Combined use of UV-C irradiation and heat treatment to improve postharvest life of strawberry fruit. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1831-1838.
- Papadakis J, 1960. *Geografía agrícola mundial*. Salvat, Barcelona, España.
- Paquin R, Lechasseur P 1979. Observations sur une méthode de dosage de la proline libre dans les extraits de plantes. *Can. J. Bot.* 57, 1851-1854.
- Paradiso A, Berardino R, de Pinto MC, di Toppi LS, Storelli MM, Tommasi F, De Gara L, 2008. Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant Cell Physiol.* 49, 362-374.
- Parks BM, Folta KM, Spalding EP, 2001. Photocontrol of stem growth. *Cur. Opin. Plant Biol.* 4, 436-440.
- Parr AJ, Bolwell GP, 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.* 80, 985-1012.
- Peet MM, 1996. *Tomato*. En: Peet MM (Ed.), *Sustainable Practices for Vegetable Production in the South*. Focus Publishing, R. Pullins Company, Newburyport, EEUU, pp 149-157.
- Peet MM, 1999. Greenhouse crop stress management. *Acta Hort.* 481, 643-654.
- Peñuelas J, Estiarte M, 1998. Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem function? *Trends Ecol. Evol.* 13, 20-24.
- Peralta IE, Spooner DM, 2007. History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). En: *Genetic Improvement of Solanaceous Crops, Vol. 2: Tomato*. Razdan MK, Mattoo AK (eds.), Science Publishers, Enfield, EEUU.

- Pérez-Alfocea F, Larher F, 1995. Sucrose and proline accumulation and sugar efflux in tomato leaf disc affected by NaCl and polyethylene glycol 6000 iso-osmotic stresses. *Plant Sci.* 107, 9-15.
- Petro-Turza M, 1986. Flavor of tomato and tomato products. *Food Rev. Intl.* 2, 309-351.
- Prohens J, Miro R, Rodriguez-Burruezo A, Chiva S, Verdu G, Nuez F, 2004. Temperature, electrolyte leakage, ascorbic acid content and sunscald in two cultivars of pepino, *Solanum muricatum*. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 79, 375–379.
- Raffo A, La Malfa G, Fogliano V, Maiani G, Quaglia G, 2006. Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1). *J. Food. Comp. Anal.* 19, 11-19.
- Rainwater DT, Grossett DR, Millhollon EP, Hanna HY, Banks SW, Lucas MC, 1996. The relationship between yield and the antioxidant defence system in tomatoes grown under heat stress. *Free Radical Res.* 25, 421-435.
- Rao AV, Agarwall S, 2000. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 563-569.
- Rao AV, Wassen Z, Agarwall S, 1998. Lycopene content of tomatoes and tomato products and their contribution to dietary lycopene. *Food Res. Intl.* 31, 737-741.
- Re R, Pellegrini A, Proteggente A, Pannala M, Yang C, Rice-Evans C, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Bio. Med.* 26, 1231-1237.
- Rice-Evans C, Miller MJ, Bolwell PG, Barmley PM, Pridham JB, 1995. The relative antioxidant activity of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.* 66, 401-436.
- Rice-Evans CA, 2000. Measurement of total antioxidant activities a marker of antioxidant status *in vivo*: procedures and limitations. *Free Radic. Res.* 33, 559-566.
- Richardson AC, Marsh KB, Bolding HL, Pickering AH, Bulley SM, Frearson NJ, Ferguson, AR, Thornber SE, Bolitho KM, Macrae EA, 2004. High growing temperatures reduce fruit carbohydrate and vitamin C in kiwifruit. *Plant Cell Environ.* 27, 423-435.
- Rivero RM, Ruiz JM, García PC, López-Lefebvre LR, Sánchez E, Romero L, 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.* 160, 315-321.
- Rivero RM, Ruiz JM, García PC, López-Lefebvre LR, Sánchez E, Romero L, 2002. Response of oxidative metabolism in watermelon plants subjected to cold stress. *Funct. Plant Biol.* 29, 643-648.

- Rivero RM, Ruiz JM, Romero L, 2004a. Importance of N source on heat stress tolerance due to the accumulation of proline and quaternary ammonium compounds in tomato plants. *Plant Biol.* 6, 702-707.
- Rivero RM, Ruiz JM, Romero L, 2004b. Oxidative metabolism in tomato plants subject to heat stress. *J. Hort. Sci. Biotech.* 79, 560-564.
- Robertson GH, Mahoney NE, Goodman N, Pavlath AE, 1995. Regulation of lycopene formation in cell suspension culture of VNFT tomato (*Lycopersicon esculentum*) by CPTA, growth regulators, sucrose, and temperature. *J. Exp. Bot.* 46, 667-673.
- Romanova AK, 2005. Physiological and biochemical aspects and molecular mechanisms of plant adaptation to the elevated concentration of atmospheric CO₂. *Russian J. Plant Physiol.* 52, 112-126.
- Rosahl S, 1996. Lipoxygenases in plants – their role in development and stress response. *Zeitschrift fur Naturforschung* 51c, 123-138.
- Ruiz JM, Bretones G, Baghour M, Belakbir A, Romero L, 1998. Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves. *Phytochem.* 48, 269-272.
- Ruiz JM, Sánchez E, García PC, López-Lefebvre LR, Rivero RM, Romero L, 2002. Proline metabolism and NAD kinase activity in greenbean plants subjected to cold-shock. *Phytochem.* 59, 473-478.
- Salin ML, 1988. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol. Plant.* 72, 681-689.
- Salles C, Nicklaus S, Septier C, 2003. Determination and gustatory properties of taste-active compounds in tomato juice. *Food Chem.* 81, 395-402.
- Sánchez E, López-Lefebvre LR, García PC, Rivero RM, Ruiz JM, Romero L, 2001a. Proline metabolism in response to highest nitrogen dosages in green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike). *J. Plant Physiol.* 158, 593-598.
- Sánchez E, Ruiz JM, Romero L, 2001b. The response of proline metabolism to nitrogen deficiency in pods and seeds of French bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) plants. *J. Sci. Food Agric.* 81, 1471-1475.
- Sánchez E, Soto JM, Núñez A, Ruiz JM, Romero L, 2005. Biosynthesis of non-structural carbohydrates and their distribution in greenbean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike): deficiency vs toxicity of nitrogen. *Rev. Fitotec. Mex.* 28, 55-61.
- Sargent SA, Maul FS, Moretti CL, Sims CA, 1997. *Harvest maturity, storage temperature and internal bruising affect tomato flavour*. En: Vavrina CS, Gilreath PR, Noling JW (Eds.). 1977 Florida Tomato Institute Proceedings. Citrus and Vegetable Magazine, University of Florida, Gainesville, FL, EEUU, p. 22-24.

- Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R, 2002. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic. Res.* 36, 177-187.
- Schobert B, Tscheche H, 1978. Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 541, 270-277
- Shi J, Le Marguer M, 2000. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit. Rev. Biotechnol* 20, 293-334.
- Shinohara Y, Suzuki Y, Shibuya M, 1982. Effects of cultivations method, growing season and cultivar on the ascorbic acid content of tomato fruits. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 51, 338-343.
- Sies H, Stahl W, 1998. Lycopene antioxidant and biological effects and its bioavailability in the human. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 218, 121-124.
- Singlenton VL, Rossi JA, 1965. Colorimetric of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Evol. Vitiant.* 16, 144-158.
- Sirjacobs M, 1988. Agro-climatological criteria for selecting the most appropriate areas for protected cultivation in Egypt. En: *Protected cultivation in the Mediterranean climate. Greenhouses in Egypt.* FAO, Roma, Italia, p. 5-14.
- Smillie RM, Hetherington SE, 1999. Photoabatement by anthocyanin shields photosynthetic systems from light stress. *Photosynthetica* 36, 451-463.
- Smirnoff N, 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Smirnoff N, ed. *Environment and plant metabolism: flexibility and acclimation.* BIOS Scientific Publishers, Oxford, Reino Unido, p. 217-243.
- Smirnoff N, 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot.* 78, 661-669.
- Smirnoff N, 2000. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355, 1455-1464.
- Smith AF, 1994. *The tomato in America: early history, culture, and cookery.* University of South Carolina Press, Columbia, S.C, EEUU.
- Soriano T, Hernandez J, Morales MI, Escobar I, Castilla N, 2004. Radiation transmission differences in east-west oriented plastic greenhouses. *Acta Hort.* 663, 91-97.
- Spalding EP, Cosgrove DJ, 1989. Large plasma-membrane depolarization precedes rapid blue-light-induced growth inhibition in cucumber. *Planta* 178, 407-410.
- Stanghellini C, 1992. Evapotranspiration in greenhouses with special reference to Mediterranean conditions. I.S.H.S. Int. Symp. Irrigation of Horticultural Crops. Almería, España. *Acta Hort.* 335, 295-304.

- Stevens MA, Kader AA, Albrigh-Holton M, Algazy M, 1977. Genotypic variation for flavour and composition in fresh market tomatoes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 102, 680-689.
- Stintzing FC, Carle R, 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, and in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 19-38.
- Strizhov N, Abraham E, Okresz L, Blickling S, Zilberstein A, Schell J, Koncz C, Szabados L, 1997. Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by *ABA1*, *ABI1* and *AXR2* in *Arabidopsis*. *Plant J.* 12, 557-569.
- Takahama U, Oniki T, 1994. Effects of ascorbate on the oxidation of derivatives of hydroxycinnamic acid and the mechanism of oxidation of sinapic acid by cell wall-bound peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 35, 593-600.
- Thomas L, 1995-1996. Hydroponic tomatoes: The flavour factor. *Growing Edge* 7, 23-26.
- Thomas RL, Jen JJ, 1975. Phytochrome-mediated carotenoids biosynthesis in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* 56, 452-453.
- Ticconi CA, Delatorre CA, Steffen A, 2001. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127, 963-972.
- Tognoni F, Serra G, 1988. Biological aspects of energy saving in protected cultivation. *Acta Hort.* 229, 17-20.
- Tognoni F, Serra G, 1989. The greenhouse in horticulture: The contribution of biological research. *Acta Hort.* 245, 46-52.
- Tomes ML, 1963. Temperature inhibition of carotene synthesis in tomato. *Bot. Gaz.* 124, 180-185.
- Toor RK, Savage GP, 2005. Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Res. Intl.* 38, 487-494.
- Toor RK, Savage GP, Lister CE, 2006. Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. *J. Food Comp. Anal.* 19, 1-10.
- Torres CA, Andrews PK, Davies NM, 2006. Physiological and biochemical responses of fruit exocarp of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants to natural photo-oxidative conditions. *J. Exp. Bot.* 57, 1933-1947.
- Tully RE, Hanson AD, Nelson CE, 1979. Proline accumulation in water stressed barley leaves in relation to translocation and the nitrogen budget. *Plant Physiol.* 63, 518-523.
- Ubi BE, 2004. External stimulation of anthocyanin biosynthesis in apple fruit. *Food Agric. Environ.* 2, 65-70.

- Villele O, 1983. Laserre, agent de modification du climat. En: *L'INRA et les cultures sous serre*. INRA, París, Francia, p. 21-27.
- Vranová E, Inzé D, van Breusegem F, 2002. Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53, 1227-1236.
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR, 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environ. Exp. Bot.* 61, 199-223.
- Walker AJ, Ho LC, 1977. Carbon translocation in tomato: carbon import and fruit growth. *Ann. Bot.* 41, 813-823.
- Wang YT, Huang SW, Liu RL, Jin JY, 2007. Effects of nitrogen application on flavour compounds of cherry tomato fruits. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170, 461-468.
- Watson R, Rodhe H, Oescheger H, Siegenthaler UO, 1990. Greenhouse gases and aerosols. En: Houghton JT *et al.* (eds) *Climate change: the scientific assessment*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, Reino Unido, p. 1-40.
- Welch RM, 2002. The impact of mineral nutrients in food crops on global human health. *Plant Soil* 247, 83-90.
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N, 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393, 365-369.
- Willekens H, Inze D, Van Montagu M, Van Camp W, 1995. Catalase in plants. *Mol. Breedings* 1, 207-228.
- Wilkens RT, Spoerke JM, Stamp NE, 1996. Differential responses of growth and two soluble phenolics of tomato to resource availability. *Ecology* 77, 247-258.
- Wyn Jones RG, Storey R, 1981. *Proline in plant resistance to stress*. En: *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants* (Paleg LG, Aspinall D, eds.). Academic Sidney Press, Sydney, Australia, p. 171-204
- Winsor GW, Adams P, 1976. Changes in the composition and quality of tomato fruit throughout the season. *Annual Report Glasshouse Crops Res. Inst.* 1975, 134-142.
- Wittwer S, Castilla N, 1995. Protected cultivation of horticultural crops, worldwide. *Horttechnology* 5, 6-23.
- Wold AB, Rosenfeld HJ, Holte K, Baugerod H, Blomhoff R, Haffner K, 2004. Colour of post-harvest ripened and vine ripened tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as related to total antioxidant capacity and chemical composition. *Intl. J. Food Sci. Technol.* 39, 295-302.
- Wolf B, 1982. A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrients status. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 13, 1035-1059.
- Wong DWS, 1989. *Mechanism and theory in food chemistry*. Van Nostrand Reinhold, New York, EEUU.

- Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N, 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of lan cells against H_2O_2 . *Plant Physiol.* 115, 1405-1412.
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus PD, Somero GN, 1982. Living with water stress-Evolution of osmolyte system. *Science* 217, 1214-1217.
- Yemm EW, Cocking EC, 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst.* 80, 209-213.
- Yu Q, Osborne L, Rengel Z, 1998. Micronutrient deficiency changes activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in tobacco plants. *J. Plant Nutr.* 21, 1427-1437.
- Yu Q, Rengel Z, 1999. Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutase in narrow-leafed lupins. *Plant Sci.* 142, 1-11.
- Zhang CS, Lu Q, Verma DPS, 1995. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 270, 20491-20496.
- Zhang D, Hamauzu Y, 2004. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chem.* 88, 503-509.