



DINÁMICA DE LOS ANTIOXIDANTES EN LA
MADURACIÓN Y POST-COSECHA
DE PIMIENTO
(*Capsicum annuum* L.)

Antioxidant systems in pepper fruits
(*Capsicum annuum* L.) during
ripening and post-harvest

Marta Rodríguez Ruiz
TESIS DOCTORAL
Granada 2017



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN

UNIVERSIDAD DE GRANADA

BIOLOGÍA FUNDAMENTAL Y DE SISTEMAS



**DINÁMICA DE LOS ANTIOXIDANTES
EN LA MADURACIÓN Y POST-COSECHA
DE PIMIENTO (*Capsicum annuum* L.)**

**Antioxidant systems in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.)
during ripening and post-harvest**

Marta Rodríguez Ruiz

TESIS DOCTORAL

Granada 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Marta Rodríguez Ruiz
ISBN: 978-84-9163-292-4
URI: <http://hdl.handle.net/10481/47382>

**DINÁMICA DE LOS ANTIOXIDANTES EN LA
MADURACIÓN Y POST-COSECHA DE PIMIENTO
(*Capsicum annuum* L.)**

Memoria que presenta la Licenciada en Ciencias Ambientales
Marta Rodríguez Ruiz
para optar al grado de Doctor



Fdo. Marta Rodríguez Ruiz

VºBº

LOS DIRECTORES DEL TRABAJO



Dr. José Manuel Palma Martínez
Profesor de Investigación del CSIC



Dr. Francisco Javier Corpas Aguirre
Investigador Científico del CSIC

El doctorando / *The doctoral candidate* **Marta Rodríguez Ruiz** y los directores de la tesis / *and the thesis supervisor/s*: **José Manuel Palma Martínez** y **Francisco Javier Corpas Aguirre**

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado resultados o publicaciones.

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Lugar y fecha / *Place and date*:

Director/es de la Tesis / *Thesis supervisor/s*:

Doctorando/ *Doctoral candidate*:

Fdo: J.M Palma

Fdo: F.J Corpas

Fdo: M. Rodríguez Ruiz

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) de Granada, dentro del grupo de investigación BIO 192 (Junta de Andalucía) con ayuda de una beca FPI asociada al proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) AGL2011-26044.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y reuniones científicas:

+ 11th International Plant Oxygen Group Conference. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants. Varsovia, Polonia. 17-19th July 2013,

- Title: Iron-superoxide dismutase from pepper (*Capsicum annuum* L): Biochemical characterization, cell localization and tissue distribution. Autores: **Rodríguez-Ruiz M.**, Álvarez de Morales P, del Río L.A., Corpas FJ, Palma JM.

+ Symposium on Oxidative Stress and Redox Signalling in Biology and Medicine. X Meeting of the Spanish Group for Research on Free Radicals (GEIRLI). Valencia 2014

- Title: Characterization and RNS modulation of the ascorbate-synthesizing enzyme galactono-1, 4-lactone dehydrogenase from pepper fruits. Autores: Mateos R., **Rodríguez-Ruiz M.**, del Río L.A., Corpas F.J, Palma J.M.

+ 5th Plant NO Club Meeting. Munich, Alemania 2014

- Title: Influence of reactive nitrogen species on the ascorbate metabolism during ripening of pepper (*Capsicum annuum* L.) fruits. Autores: **Rodríguez-Ruiz M.**, Álvarez de Morales P., Corpas F.J., Palma J.M.

+ XXI Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. XIV Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Toledo 2015

- Title: Interplay between reactive nitrogen species (RNS) and the ascorbate metabolism in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). Autores: **Rodríguez- Ruiz M.**, Codesido V., Corpas FJ., Palma JM.

+ 12th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants: from model systems to field. Verona, Italia 2015

- Title: Peroxisomes from pepper fruits: new perspectives on the organelle metabolism. Autores: **Rodríguez-Ruiz M.**, Álvarez de Morales P., Reumann S., Corpas F.J., Palma J.M.

+ XI Reunión del Grupo Español de Investigación en Radicales Libres (GEIRLI). Granada 2016

- Title: Modulation of ascorbate biosynthesis in pepper fruits by nitric oxide (NO). Autores: **Rodríguez-Ruiz M.**, Mateos R.M, Corpas F.J., Palma J.M.

- Title: Molecular modeling of plant catalases and docking studies with GSNO. Autores: López-Jaramillo J., **Rodríguez-Ruiz M.**, Barroso J.B., Palma J.M., Corpas F.J.

+ 6th Plant Nitric Oxide International Meeting. Granada 2016

-Título: Funtion of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) during pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit ripening. Autores: **Rodríguez-Ruiz M.**, Palma J.M., Corpas F.J.

- Title: Alternative fluorimetric-based method to detect and quantify total S-nitrosothiols in plants. Autores: Mito P., **Rodríguez-Ruiz M.**, Corpas F.J, Freschi L., Mercier H.

+ Congreso PIISA (2016) (Proyecto de Iniciación a la Investigación e Innovación en Secundaria en Andalucía)

- Title: “What pepper beneath”. Biochemical and molecular characterization of catalase in pepper fruit. Sáez L., Jiménez M., García A, Adamuz D, Ruiz C., **Rodríguez-Ruiz M.** High School Students for Agricultural Science Research. Vol. 5.1-7. ISSN: 2340- 9746.

Parte de los resultados de esta Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- **Rodríguez-Ruiz M.**, Mito P., Palma J.M., Corpas F.J. (2016) S-Nitrosogluthione reductase (GSNOR) activity is down-regulated during pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit ripening. *Nitric Oxide*. DOI/10.1016/j.niox.2016.12.011
- **Rodríguez-Ruiz M.**, Mateos R.M., Codesido V., Corpas F.J., Palma J.M. (2017) Characterization of the galactono-1,4- lactone dehydrogenase from pepper fruits and its modulation in the ascorbate biosynthesis. Role of nitric oxide. *Redox Biology* **12**, 171-181. DOI/10.1016/j.redox.2017.02.009.



Creo que esta puede ser una de las partes más complicadas de mi Tesis ya que a lo largo de todos estos años me han ayudado tantas personas que seguro que olvidaré alguna de ellas y no por ello estoy menos agradecida.

Debo comenzar estos agradecimientos por mis dos directores, Pepe y Javier, que además de formarme y ser unos referentes para mí en el ámbito profesional. Han sido los mejores guías en este arduo proceso, ¡qué más puedo pedir!

Debo agradecerles la oportunidad que me dieron al aceptarme como parte de su equipo, la confianza que depositaron, la paciencia, sus grandes consejos y todo lo que me han enseñado durante estos años. El resultado de mi trabajo ha sido gracias a ellos. He tenido la suerte de trabajar con dos personas cuya calidad personal y profesional son insuperables. Uno de los grandes objetivos para mí durante esta Tesis ha sido demostrarles todo lo que me han enseñado y estar a la altura de las circunstancias. Y sobre tengo que agradecerles el haberme hecho disfrutar de este trabajo y de la ciencia.

Un especial agradecimiento a Carmelo, sin él yo no me hubiese embarcado en este proyecto y por supuesto no hubiese conocido a este grupo. Gracias por ser una pieza clave de este trabajo, por enseñarme tanto en el terreno laboral como en el personal y por supuesto gracias por tener siempre una frase de esas que no sabes si has entendido pero que te arregla el día. Cómo olvidarme de mi Marichu, esa compañera que a veces hace de madre, otras de hermana y siempre de amiga y que por supuesto me ha enseñado tanto y ha soportado tantas horas de laboratorio conmigo. Sé que con ellos he finalizado una etapa muy importante pero que seguirán conmigo en las que están por venir.

Gracias a Silvia, por su calidez, sus consejos y por enseñarme tanto; estos últimos meses no habrían sido lo mismo sin ti. Gracias a mis compañeros Paz, Eduardo y Luis Alfonso por mostrarme siempre palabras de apoyo y por ayudarme en todo. Y gracias a todas las personas que han estado en el laboratorio conmigo, ya que de una forma o de otra habéis sido parte del resultado final. En definitiva gracias a todo mi grupo ARNOBA, porque no solo me llevo conocimiento sino también unos momentos maravillosos a vuestro lado.

A mis padres, porque lo son todo para mí, mi ejemplo a seguir y mis dos grandes guías; sin ellos nada de esto hubiese sido posible, un gracias se queda pequeño para todo lo que han hecho por mí. A mis hermanos, Carolina y Luis, dos de las personas que más quiero y a las que más admiro. Tener unos pilares como vosotros es lo que me ha ayudado en muchas ocasiones a no tirar la toalla.

A Javi, mi complemento y mi apoyo. Gracias por no dejar de creer en mí, por tener siempre esa palabra de ánimo que ha hecho que siga en los momentos más difíciles, y por acompañarme con una sonrisa y una actitud positiva; tengo que agradecerte tantas cosas y tantos momentos que no hay espacio en esta Tesis para plasmarlo. A mi Cristi, otro de mis pilares, gracias por estar ahí y ser como una hermana, a pesar de la distancia siempre me has animado y has apostado por tu amiga. A mi gran amigo Dani, que ha sacado tiempo del que no tiene para ayudarme, gracias por esos maravillosos pimientos que visten estas páginas.

“Si he conseguido ver más allá ha sido porque estaba subido sobre los hombros de gigantes”.

Isaac Newton, 1643-1727

A mis padres y mis hermanos



ÍNDICE

RESUMEN/ SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN/ INTRODUCTION	13
1. El Pimiento: Historia, distribución e importancia económica.....	15
2. Taxonomía, morfología y tipos de pimiento	16
3. Características nutricionales.....	20
4. Maduración y post-cosecha.....	21
5. Metabolismo de las especies de oxígeno reactivo (ROS) y sistemas antioxidantes.....	25
5.1. Especies de oxígeno reactivo (ROS).....	25
5.2. Sistemas antioxidantes	29
5.2.1. Antioxidantes enzimáticos	29
5.2.2. Antioxidantes no enzimáticos	34
6. Metabolismo del óxido nítrico (NO) y de las especies de nitrógeno reactivo (RNS) en plantas superiores	42
6.1. Producción de NO en plantas.....	42
6.2. Funciones del NO en plantas.....	44
6.3. Especies de nitrógeno reactivo (RNS) y estrés nitrosativo	46
6.4. Modificaciones post-traduccionales (PTMs)	48
OBJETIVOS/ OBJECTIVES.....	51
MATERIAL Y MÉTODOS/ MATERIALS AND METHODS	57
1. Material vegetal.....	59
2. Tratamiento de plantas de pimiento con distintas condiciones experimentales.....	61
2.2. Alta intensidad lumínica	61
2.3. Daño mecánico.....	62
3. Tratamiento de frutos de pimiento en una atmósfera enriquecida con óxido nítrico (NO).....	62
4. Preparación de extractos crudos para ensayos bioquímicos.....	63
4.1. Homogenados de frutos.....	63
4.2. Homogenados de hojas, raíces, flores y tallos	64
4.3. Fracciones subcelulares enriquecidas en mitocondrias	64
5. Aislamiento y purificación de peroxisomas de fruto de pimiento	65
6. Determinación de actividades enzimáticas	66
6.1. L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH; EC 1.3.2.3).....	66
6.2. Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)	66
□ Ensayo espectrofotométrico.....	66
□ Actividad isoenzimática en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes.....	67

6.3. Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)	67
□ Ensayo espectrofotométrico	67
□ Actividad isoenzimática en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes	68
6.4. Monodeshidroascorbato reductasa (MDAR; EC 1.6.5.4).....	68
6.5. Deshidroascorbato reductasa (DAR; EC 1.8.5.1	68
6.6. Peroxidasas.....	70
□ Ensayo espectrofotométrico	70
□ Actividad isoenzimática en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes	70
6.7. Glutación reductasa (GR; EC 1.6.4.2)	69
6.8. Nitrosoglutación reductasa (GSNOR; EC 1.2.1.1)	69
□ Ensayo espectrofotométrico	69
□ Actividad en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes	69
6.9. Citocromo <i>c</i> oxidasa (CCO; EC 1.9.3.1).....	70
6.10. Superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1).....	71
□ Análisis isoenzimático en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes	71
7. Determinación de actividades enzimáticas en presencia de moduladores	72
8. Electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA).....	73
8.1. EGPA en condiciones desnaturalizantes (EGPA-SDS)	73
8.2. EGPA en condiciones nativas	73
9. Isoelectroenfoque (IEF).....	74
10. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida	74
10.1. Azul Coomassie.....	74
10.2. Nitrato de plata	75
11. Identificación de S-nitrosotioles proteicos en geles de poliacrilamida	75
12. Determinación del tamaño molecular nativo de la catalasa	77
12.1. Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida	77
12.2. Filtración molecular mediante cromatografía por FPLC.....	78
13. Electroelución de proteínas de los geles de poliacrilamida	79
14. Transferencia e inmunodetección de proteínas (<i>western blotting</i>).....	79
14.1. Transferencia de proteínas.....	79
14.2. Inmunodetección de proteínas por quimioluminiscencia	80
15. Purificación por afinidad de la IgG	81
16. Extracción, derivatización y análisis de metabolitos mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GS-MS).	82
16.1. Extracción.....	82
16.2. Derivatización	82

16.3. Análisis de muestras por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS)	83
17. Otras determinaciones bioquímicas	83
17.1. Contenido de ascorbato y glutatión	83
17.2. Peroxidación lipídica	84
17.3. Determinación de carotenos y clorofilas en extractos de frutos de pimiento	84
17.4. Concentración de proteínas	85
18. Extracción, cuantificación y análisis de RNA	86
18.1. Extracción de RNA total	86
18.2. Cuantificación de RNA	86
18.3. Electroforesis en geles de agarosa	86
19. Síntesis de cDNA, PCR semicuantitativa y PCR cuantitativa a tiempo real	87
19.1. Obtención de cDNA por transcripción inversa (RT)	87
19.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	88
19.3. PCR semicuantitativa	88
19.4. PCR cuantitativa a tiempo real	89
19.5. Análisis de datos	90
20. Análisis estadísticos	91
21. Análisis de imágenes	91
CAPÍTULO 1/ CHAPTER 1	93
CARACTERIZACIÓN DE CATALASA Y PEROXIDASAS DE FRUTO DE PIMIENTO	93
1.1. INTRODUCCIÓN/ INTRODUCTION	95
1.2. RESULTADOS/ RESULTS	100
1.2.1. Clorofilas y carotenoides	101
1.2.2. Peroxidación lipídica	102
1.2.3. Catalasa de frutos de pimiento	102
□ Actividad total e isoenzimática	102
□ Modulación de la actividad catalasa por peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) en frutos de pimiento	104
□ Estabilidad de la catalasa de frutos de pimiento en función del tiempo	106
□ Modulación de la actividad catalasa en frutos de pimiento en presencia de donadores de NO y agentes reductores	108
□ Caracterización molecular de la catalasa de frutos de pimiento	110
1.2.4. Peroxidasas (POD)	114
□ Guayacol peroxidasa	114
□ Actividad isoenzimática	115
1.3. DISCUSIÓN/ DISCUSSION	117

CAPÍTULO 2/ CHAPTER 2	123
SUPERÓXIDO DISMUTASAS (SODs) DE PIMIENTO. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS. MODULACIÓN Y FUNCIÓN DE LA Fe-SOD.	123
2.1. INTRODUCCIÓN/ INTRODUCTION	125
2.2. RESULTADOS/ RESULTS.....	128
2.2.1. Superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) en frutos de pimiento.....	128
□ Caracterización de la Fe-SOD en distintos órganos de pimiento	128
□ Actividad y caracterización de las SODs en distintas variedades de pimiento autóctonas.	130
□ Caracterización del anticuerpo de la Fe-SOD en diferentes especies vegetales.....	132
□ Localización subcelular de la Fe-SOD en frutos de pimiento	133
□ Efecto del NO sobre la actividad SOD en frutos de pimiento.....	135
□ Modulación de la actividad SOD isoenzimática en frutos de pimiento en presencia de donadores de NO, agentes reductores y oxidantes	135
□ Efecto de diferentes estreses abióticos sobre la actividad isoenzimática SOD en plantas de pimiento.....	137
□ Daño mecánico	137
□ Estrés por alta intensidad lumínica.....	139
2.3. DISCUSIÓN/ DISCUSSION	140
CAPITULO 3/CHAPTER 3	145
METABOLISMO DEL ASCORBATO EN FRUTOS DE PIMIENTO: BIOSÍNTESIS Y CATABOLISMO.	145
3.1. INTRODUCCIÓN/ INTRODUCTION	147
3.2. RESULTADOS/ RESULTS.....	151
3.2.1. Caracterización molecular e inmunológica de la GalLDH en frutos de pimiento.....	152
□ Modulación de la GalLDH de frutos de pimiento por RNS	155
□ Modulación de la actividad GalLDH de frutos de pimiento por agentes reductores y oxidantes.....	157
3.2.2 Enzimas del ciclo ascorbato-glutatión: maduración y modulación por RNS	158
□ Maduración de frutos.....	158
□ Efecto del óxido nítrico <i>in vivo</i> en las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión.....	160
□ Modulación <i>in vitro</i> de la ascorbato peroxidasa por RNS	162
3.2.3 Metabolitos implicados en la síntesis y degradación de ascorbato en frutos de pimiento y otros metabolitos de interés: efecto del NO	163
□ Metabolitos de síntesis de ascorbato.	163
□ Metabolitos relacionados con la degradación de ascorbato.....	165
□ Metabolitos de interés en la maduración de los frutos de pimiento	167

3.3. DISCUSIÓN/ DISCUSSION.....	172
CAPÍTULO 4/ CHAPTER 4.....	179
S- NITROSOGLUTATIÓN REDUCTASA (GSNOR) EN FRUTOS DE PIMIENTO	179
4.1.INTRODUCCIÓN/ INTRODUCTION	181
4.2.RESULTADOS/ RESULTS	186
4.2.1. GSNOR en frutos de pimiento: actividad específica, contenido proteico y expresión genética	186
4.2.2. Efecto del NO sobre la actividad GSNOR en frutos de pimiento	187
4.2.3 Detección de S-nitrosotioles proteicos en frutos de pimiento verde y rojo.....	189
4.3.DISCUSIÓN/ DICUSSION	192
DISCUSIÓN GENERAL/ OVERALL DISCUSSION.....	197
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	209
BIBLIOGRAFÍA/ REFERENCES	215

RESUMEN
SUMMARY

Dinámica de los antioxidantes en la maduración y post-cosecha de pimiento

(*Capsicum annuum* L.)

La maduración y post-cosecha de frutos de pimiento son procesos que tienen asociados cambios drásticos en el metabolismo, así como en sus características fenotípicas, siendo el cambio de color el más evidente, como resultado de la degradación de las clorofilas y la concomitante síntesis de nuevos pigmentos. Dentro de los cambios metabólicos que se producen hay que destacar los asociados a los sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, que están implicados en la modulación de los niveles de las especies de oxígeno reactivo (ROS).

Esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de la dinámica de los sistemas antioxidantes que operan durante la maduración y la post-cosecha en el fruto de pimiento, en especial en el **ascorbato** (AsA), y en los de naturaleza enzimática **catalasa** (CAT), **superóxido dismutasa** (SOD), **ascorbato peroxidasa** (APX) y **peroxidases** (POD), empleándose aproximaciones bioquímicas y moleculares. Así, se ha observado una disminución de la actividad CAT contrario al aumento que se producía en las PODs o en la SOD, y que podría estar regulado por especies de nitrógeno reactivo (RNS) durante la maduración de los frutos.

Por otro lado, debido a que el pimiento es una de las hortalizas con mayor contenido en ascorbato, durante este trabajo se han investigado algunos de los mecanismos implicados en su síntesis y degradación. Para ello se han estudiado a nivel bioquímico y molecular enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de AsA, como la **L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa** (GalLDH) que, durante la maduración, ve aumentada su actividad. Se comprobó también que enzimas relacionadas con la utilización de ascorbato, como la APX, incrementaban su actividad durante este proceso, al igual que ocurría con la GalLDH. Asimismo, se investigó la interacción de estas enzimas del metabolismo del ascorbato con las RNS y su potencial regulación por estas especies durante la maduración de los frutos. Además, en esta Memoria se aportan datos preliminares sobre los niveles de metabolitos implicados en la síntesis y degradación de ascorbato (galactosa, mio-inositol, y treonina, entre otros), obtenidos mediante la técnica de espectrometría de masas combinada a la cromatografía de gases (GC-MS).

El **óxido nítrico** (NO) es un radical implicado en numerosos procesos fisiológicos. Durante esta Tesis Doctoral se ha estudiado el efecto de la aplicación de atmósferas enriquecidas en NO sobre los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en frutos de pimiento. Asimismo se han llevado a cabo estudios *in vitro* de la acción del NO y otras especies de nitrógeno reactivo (RNS) sobre la actividad de ciertas enzimas antioxidantes que podría estar mediada por posibles modificaciones post-traduccionales (nitración y *S*-nitrosilación). Paralelamente se determinó la actividad de la **nitrosoglutación reductasa** (GSNOR) y se analizó el nivel de los **nitrosotioles proteicos** (SNOs) durante la maduración de los frutos, observándose cómo la actividad enzimática de la GSNOR disminuía frente al aumento de los SNOs a lo largo de dicho evento.

En conjunto, los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral nos han permitido profundizar en cómo los sistemas antioxidantes y el NO participan en la maduración de frutos de pimiento en una forma que parece predecir la existencia de una comunicación muy activa entre ellos durante dicho proceso fisiológico.

Antioxidant systems in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) during ripening and postharvest.

Pepper fruit ripening and post-harvest are processes that have associated drastic changes in the metabolism, as well as in its phenotypic characteristics, being the colour change the most evident, as a result of the degradation of the chlorophylls with the concomitant synthesis of new pigments. Among the metabolic changes which take place, it is important to highlight the antioxidant systems, both enzymatic and non-enzymatic, that are involved in the modulation of reactive oxygen species (ROS) levels.

This PhD Thesis has been focused on the study of the antioxidant systems that operate during pepper fruit ripening and post-harvest, especially on **ascorbate** (AsA) and on the antioxidant enzymes **catalase** (CAT), **superoxide dismutase** (SOD), **ascorbate peroxidase** (APX) and **peroxidases** (POD), using biochemical and molecular approaches. Thus, it has been observed that the metabolism of these antioxidant enzymes was regulated during the ripening of the fruits, possibly through reactive nitrogen species (RNS), with a decrease of the CAT activity in comparison with the increase that occurred in the PODs and the SOD, indicating the relevance of these enzymes during this physiological process.

Considering that pepper fruit is one of the vegetables with the highest ascorbate content, during this work some of the mechanisms involved in its synthesis and degradation have been addressed. For this purpose, we have studied at biochemical and molecular level enzymes involved in the biosynthetic pathway of AsA such as **L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase** (GalLDH), which, during ripening, underwent an activity increase. It was also found that enzymes related to the use of ascorbate, such as APX, increased their activity during this process, as it occurred with GalLDH. Likewise, the interaction of these enzymes of the ascorbate metabolism with RNS was investigated as well as their potential regulation during ripening of fruits by these species. Besides, this Memory reports preliminary data on the levels of metabolites involved in the synthesis and degradation of ascorbate (galactose, myo-inositol, and threonine, among others), as determined by using the gas chromatography/mass spectrometry approach (GC-MS).

Nitric oxide (NO) is a free radical molecule involved in numerous physiological processes. During this PhD thesis, the effect of NO-enriched atmospheres on enzymatic and non-enzymatic antioxidant in pepper fruits has also been studied. Moreover, *in vitro*

assays of the NO and other reactive nitrogen species (RNS) effects on the activity of certain antioxidant enzymes which could be mediated by post-translational modifications such as nitration and S-nitrosylation have been also carried out. At the same time, the **nitrosogluthathione reductase** (GSNOR) activity and the level of **protein nitrosothiols** (SNOs) during fruit ripening were also analyzed. Thus, it was found that whereas the GSNOR activity lowered, the protein SNOs increased throughout this physiological event.

In summary, the obtained data in this PhD Thesis have allowed us to get deeper knowledge on the pepper fruits ripening where both antioxidant systems and NO metabolism participate with a very active interaction.

INTRODUCCIÓN
INTRODUCTION

1. El Pimiento: Historia, distribución e importancia económica

Los orígenes del pimiento (*Capsicum annuum* L.) se sitúan principalmente en América de Sur, en las zonas de Bolivia y Perú desde las cuales fue exportado a Europa. Su nombre “*Capsicum*” proviene del latín y significa “caja”, haciendo referencia a la forma tan característica de los pimientos.

Su introducción en Europa supuso un enorme cambio a nivel nutricional, agronómico y económico ya que se ha convertido en la segunda hortaliza más consumida a nivel mundial por detrás del tomate. Así, y de acuerdo con los datos facilitados por la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (<http://www.fao.org>), la producción mundial de los frutos de pimiento (dulces y picantes) ha pasado de una producción de 13 a 31 millones de toneladas entre 1994 y 2014, lo cual implica un aumento de 2,4 veces en tan solo 20 años.

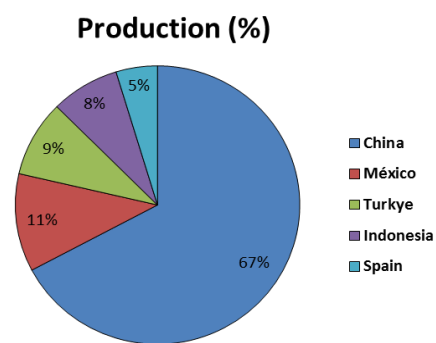


Figure 1. Percentage of pepper fruits production by countries in 2014. Data source FaoStat. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

El pimiento es una hortaliza que se destina para varios usos, siendo el principal de ellos, el consumo en fresco, seguido del secado de pimiento para producir pimentón, la fabricación de conservas y el uso de variedades picantes como especias.

Posiblemente estas utilidades tan diversas, le han hecho cobrar un valor comercial importante a nivel mundial. Dentro de los principales productores de pimiento, generalmente de pimiento picante, encontramos: China, Turquía, México, Indonesia y España (Fig.1). Sin embargo, dentro de los rendimientos de cada país es España quien posee una posición privilegiada, ya que es uno de los países con mayor obtención de kilogramos por hectárea (Tabla 1). En España, el pimiento es uno de los cultivos hortícolas bajo invernadero con mayor superficie cultivada siendo el primer exportador de la Unión Europea y uno de los tres primeros exportadores mundiales junto con China y EE.UU. A nivel nacional, casi la mitad de la producción de pimiento

dulce se sitúa en Almería (región líder) y Murcia, aunque su cultivo se encuentra distribuido por todo el país. En la región almeriense suelen cultivarse los pimientos en la temporada otoño-invierno, mientras que en Murcia suele ser en primavera-verano. Estos cambios en la época de cultivo y por las condiciones ambientales en cada región hacen que los pimientos posean características diferentes.

Table 1. Pepper (*Capsicum annuum* L.) yield (kg/ha) by country in 2014. Data source FaoStat <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.

Country	Yield (kg/ha)
Spain	61057
China	22610
Turkey	21069
México	19047
Indonesia	7113

2. Taxonomía, morfología y tipos de pimiento

El pimiento (*Capsicum annuum* L.) es una especie anual de origen tropical perteneciente a la familia *Solanaceae*. Es una herbácea de porte variable entre 0,5 m (en variedades al aire libre) y más de 2 m (híbridos cultivados en invernadero) (Fig. 2 a). El fruto, que es no climatérico, tiene forma de *baya hueca*, con diferentes coloraciones (Fig. 2 c). Su sistema radicular, que puede alcanzar 0,6 m de profundidad en función de la altura del suelo y de su textura, generalmente está formado por una raíz pivotante que posteriormente desarrolla un sistema radicular lateral que puede cubrir hasta 1,2 m de diámetro. El tallo es de crecimiento limitado y, dependiendo de la variedad, presenta un número determinado de tallos secundarios que a su vez se ramifican de forma dicotómica (Fig. 2 a).

La hoja es entera, lampiña y lanceolada con un pecíolo largo y poco aparente. El haz es glabro (liso y suave al tacto), de color verde más o menos intenso (dependiendo de la variedad) y brillante (Fig. 2 a). Las hojas se insertan en el tallo de forma alterna y su tamaño es variable en función de la variedad, existiendo cierta correlación entre el tamaño de la hoja adulta y el peso medio del fruto. Las flores aparecen solitarias en cada nudo del tallo, con inserción en las axilas de las hojas. Son pequeñas y constan de una corola blanca que en ocasiones pueden ser blanco-verdosas y rara vez violáceas (Fig. 2 b). La polinización es autógama, aunque puede presentarse un porcentaje de alogamia

que no supera el 10% (Cochran 1938; DeWitt & Bosland 1993). Las semillas se encuentran insertas en una placenta cónica de disposición central. Son redondeadas, ligeramente reniformes, de coloración amarillo pálido y con forma y longitud variable según especies y variedades (Fig. 2.c).

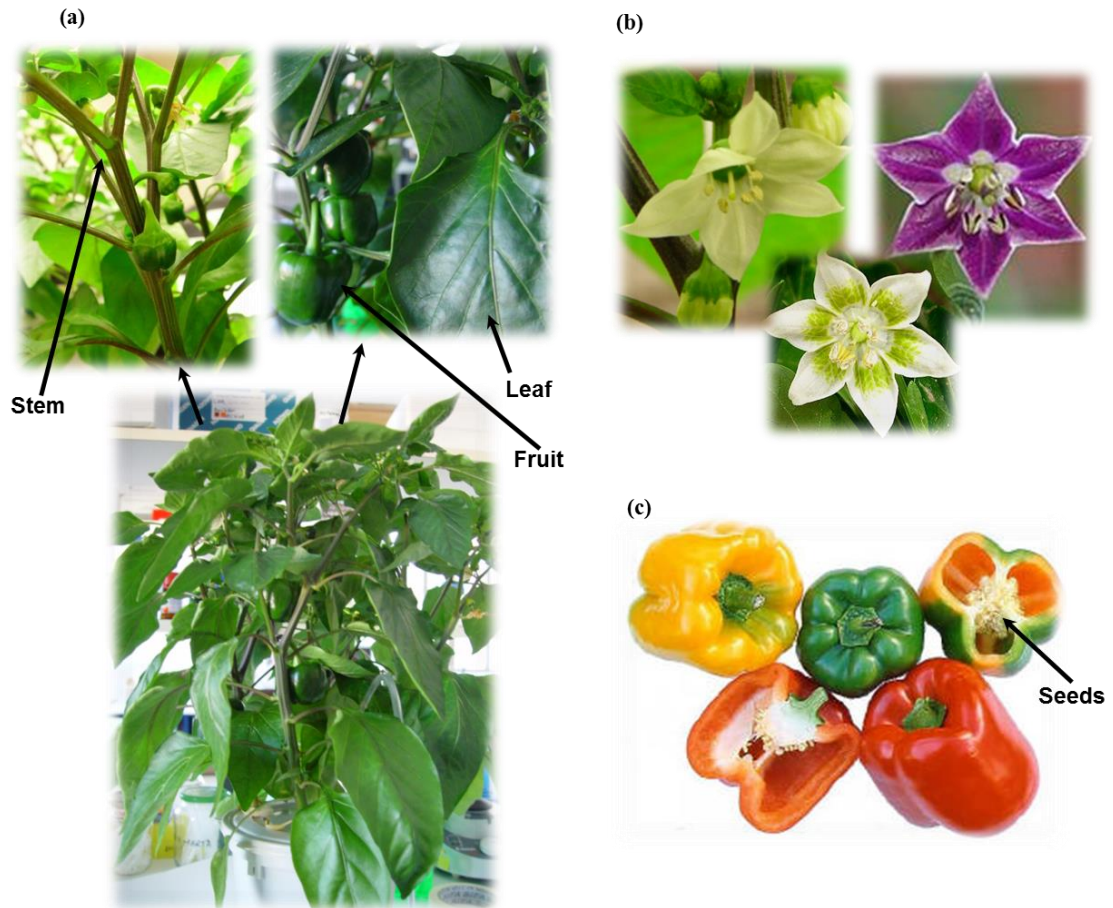


Figure 2. Morphology of pepper plants. a) Pepper plant grown in green house and showing: stem, leaves and fruits; b) Types of *Capsicum* flowers; c) Pepper fruits: Inmature (green) and mature (red and yellow) and seeds.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el pimiento es una especie no climática, lo que implica que su maduración no está condicionada por la síntesis de etileno y la respiración (Saltveit, 1977; Lurie et al., 1986). Dentro del término *Capsicum annuum* se engloban muchas variedades que se diferencian en forma, tamaño, color (Fig. 3), sabor, usos culinarios, así como por su amplia distribución. De forma general los frutos inmaduros de pimiento son verdes y viran a rojo, amarillo, naranja e incluso violeta, dependiendo de la variedad, cuando maduran (DeWitt & Bosland 1996).



Figure 3. *Capsicum* varieties. Photo by David Baumler.

El pimiento puede clasificarse en base a sus características culinarias y organolépticas quedando divididos en pimiento dulce y picante. Si utilizamos el criterio de la forma, el pimiento dulce en este caso puede clasificarse en tres tipos (Fig. 4) (Mateos *et al.* 2013):

- **Tipo California:** son frutos caracterizados por presentar los ejes longitudinales y transversales de tamaño similar; son frutos cortos y anchos con una forma cuadrada, “de caja”, con tres o cuatro cascotes. Presentan un mesocarpio carnoso y de grosor variable. Suelen virar durante la maduración de verdes a rojo/amarillo o naranja y son los cultivares más sensibles y exigentes en temperatura. Por ello, este cultivar suele plantarse temprano (en función de la climatología de la zona, suele ser desde mediados de mayo a principios de agosto) con el fin de evitar problemas durante el cuajado provocados por el descenso de temperatura y para alargar el ciclo vegetativo (Fig. 4a).
- **Tipo Lamuyo:** frutos alargados y cuadrados de carne gruesa. Menos sensibles a los cambios de temperatura y con un porte vigoroso (mayor porte y entrenudos largos). Suelen cultivarse en ciclos más tardíos (Fig. 4b).
- **Tipo Dulce italiano:** son frutos estrechos, alargados y acabados en punta, de carne fina, que se cultivan en ciclo único. Suelen ser más tolerantes al frío por lo que su plantación es tardía, en septiembre y octubre y la recolección entre diciembre y mayo (Fig. 4c).

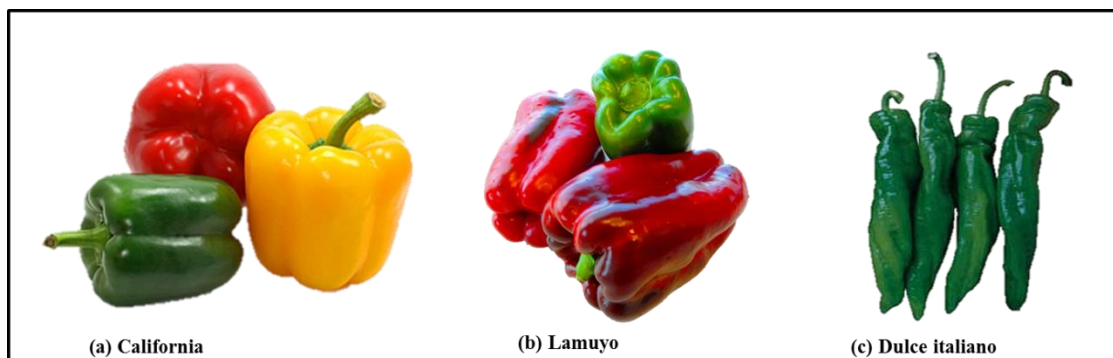


Figure 4. Phenotypes of the different types of pepper. a) California. b) Lamuyo. c) “Dulce italiano”

Uno de los compuestos más característicos del pimiento, y especialmente de los pimientos picantes, es la capsicina. La capsicina es un alcaloide de naturaleza fenilpropanoide producido principalmente en el género *Capsicum* y que es responsable de la acrimonia de los frutos picantes. Es un compuesto perteneciente a la familia de los capsicinoides, que está formada por al menos 22 miembros, donde el principal es la capsicina. Este compuesto junto con la dihidrocapsicina representan el 90% de esta familia en los frutos de pimiento picante (Reyes-Escogido *et al.* 2011), y están localizados en la vacuola de las células epidérmicas de la placenta y del septo del fruto (Ishikawa 2003; Garcés-Claver *et al.* 2007). La concentración de este compuesto aumenta a lo largo del desarrollo, alcanzando sus valores más altos cuando el fruto adquiere el mayor tamaño. Posteriormente, este compuesto es degradado en productos secundarios mediante la acción de peroxidasas (Estrada *et al.* 2002; Ishikawa 2003; Sung *et al.* 2005; Sharma *et al.* 2013; Srinivasan 2014; Palma *et al.* 2015).

Diferentes trabajos han mostrado que los capsicinoides, y en particular la capsicina, poseen una gran variedad de actividades biológicas y fisiológicas que los dota de ciertas funciones tales como actuar como antioxidantes (Materska & Perucka 2005; Reyes-Escogido *et al.* 2011), anticancerígenos (Macho *et al.* 2003), estimulantes del metabolismo energético y supresores de la acumulación de grasas (Materska & Perucka 2005) y como anti-inflamatorios, aunque estas aplicaciones son aún limitadas debido a la irritación provocada por su acrimonia (Reyes-Escogido *et al.* 2011).

Al ser cultivos propios de climas tropicales, son importantes los factores como la temperatura, la humedad relativa, el tipo de suelo, la luz o el riego. Son plantas con una

temperatura óptima de cultivo que oscila entre 15-30°C, lo que hace que los cambios de temperatura generen alteraciones en las funciones fisiológicas y morfológicas durante el desarrollo, y eso convierte estos factores en esenciales para la evolución adecuada del cultivo (Martí *et al.* 2011). No aguantan heladas y exigen climas cálidos o templados. Su temperatura mínima de germinación y crecimiento es de 15°C y la de floración y fructificaciones como mínimo, de 18°C. De hecho en épocas más frías, como las de otoño o invierno, este cultivo se da en invernadero. Tanto las altas como las bajas temperaturas generan problemas en el cultivo. Las bajas temperaturas (10-15°C) provocan malformaciones en las flores, frutos de pequeño tamaño con deformaciones y reducción en la viabilidad del polen. Por otro lado, las altas temperaturas provocan la caída de flores y frutos (Pressman *et al.* 1998; Erickson & Markhart 2002; Shaked *et al.* 2004; Pressman *et al.* 2006; Airaki *et al.* 2012; Mateos *et al.* 2013).

Durante el desarrollo de la planta es necesaria una humedad relativa entre 50-70%. Si la humedad relativa es demasiado elevada pueden desarrollarse enfermedades en las partes aéreas de la planta que dificultan su fecundación. Si la humedad relativa es baja y está acompañada de temperaturas altas, se produce la caída de flores y de los frutos recién cuajados.

El pimiento es un cultivo que necesita gran cantidad de luz, sobre todo en el primer periodo de crecimiento después de la germinación (Erickson & Markhart 2001), y suelos con buen drenaje, ricos en materia orgánica, sueltos, arenosos y profundos. Se debe mantener un riego constante y moderado durante todas las fases de cultivo, a pesar de que toleran bien una falta puntual de agua; sin embargo, los suelos encharcados provocan la aparición de hongos en las raíces y la pudrición de éstas. La forma ideal de riego es por goteo, ya que la aspersion da lugar al desarrollo de hongos al mojar las hojas y los frutos. Estas particularidades hacen que la mayoría de los pimientos sean cultivados en invernaderos para el manejo de las condiciones propias del cultivo (<http://www.redpermacultura.org>).

3. Características nutricionales

Entre las características nutricionales del pimiento destaca su alto contenido en agua (90%) y su contenido en fibra, pectinas, glucosa y fructosa, lo que le hace ser una

hortaliza de bajo aporte calórico y proteico, por lo que, al igual que el resto de verduras, apenas aporta grasa.

Los pimientos, son una fuente natural de antioxidantes. Entre ellos encontramos los carotenoides como fuente de vitamina A, responsables de del color en los frutos maduros, cualidad debida fundamentalmente a la capsantina; la vitamina E o α -tocoferol, que retarda o inhibe la oxidación lipídica, ya que actúa como secuestrador de radicales lipídicos (Smirnoff & Wheeler 2000); y la vitamina C, siendo el pimiento uno de los productos agrícolas, incluyendo frutas y verduras, con mayor contenido de vitamina C o ascorbato, con valores por encima de frutas como la naranja o la fresa (Martí *et al.* 2011; Palma *et al.* 2011a). La vitamina C, además de ser un potente antioxidante, interviene en procesos como la formación de colágeno, glóbulos rojos, huesos y dientes, al mismo tiempo que favorece la absorción del hierro de los alimentos y aumenta la resistencia frente a infecciones (Davey *et al.* 2000; Martínez *et al.* 2005). Aunque en menor cantidad también encontramos vitaminas del grupo B (B6, B3, B2 y B1) (Howard *et al.* 2000; Navarro *et al.* 2006; Mateos *et al.* 2013). Factores como el estado de maduración, condiciones ambientales o el almacenamiento de los frutos condicionan el contenido de estos antioxidantes (Jiménez *et al.* 2003; Martínez *et al.* 2005; Navarro *et al.* 2006). Entre los minerales encontramos hierro, potasio, magnesio, fósforo y calcio (Palma *et al.* 2016).

4. Maduración y post-cosecha

La maduración es un proceso altamente coordinado, programado genéticamente e irreversible que conlleva una serie de cambios fisiológicos, bioquímicos y organolépticos que desembocan finalmente en un fruto maduro, comestible y apto para el consumo humano, en aquellos que se destinan a este fin. Las rutas involucradas en los procesos de desarrollo y maduración son exclusivas en plantas y varían en función de la especie y en las que están implicados un gran número de genes y proteínas (Klie *et al.* 2014). Como ejemplo de ello tenemos al **pimiento**; durante el desarrollo y la maduración del pimiento se producen una serie de cambios unidos a un intenso metabolismo (Fig. 5) (Howard *et al.* 2000; Palma *et al.* 2011b; Mateos *et al.* 2013a; Palma *et al.* 2015). Uno de los cambios que tiene lugar durante este proceso es el viraje de color. Los frutos inmaduros de color verde viran a un color rojo/amarillo/naranja o violeta al alcanzar la madurez fisiológica. La conversión de cloroplastos a cromoplastos

Introducción/ Introduction

provoca cambios a nivel bioquímico como es la acumulación de carotenoides (licopeno y capsantina, entre otros). Estas modificaciones son aparentes a nivel de coloración, ya que tras la destrucción de la clorofila, se pasa del color verde característico de éstas al amarillento rojizo de los carotenoides (Bouvier *et al.* 1998). A nivel subcelular, aparte de la transformación de los plastidios, conviene destacar la implicación de los peroxisomas y las mitocondrias durante la maduración de frutos (Jiménez *et al.* 2002; Mateos *et al.* 2003; Palma *et al.* 2015)

Durante la maduración también tiene lugar la emisión de compuestos volátiles como ésteres, aldehídos y compuestos azufrados, entre otros, provocada por el fuerte metabolismo asociados a la respiración (Csóka *et al.* 2013), a la vez que se da la formación de pectinas y síntesis de proteínas. Otro de los cambios relevantes, es la alteración del sabor y la textura, y que generalmente tiene lugar un cambio en la acidez y el pH. Cuando el fruto alcanza la madurez, el almidón es transformado en azúcares simples y al mismo tiempo se van acumulando ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, lo que provoca un aumento en el amargor y la astringencia.

Finalmente, el fruto durante la maduración tiene cambios texturales, como el ablandamiento. Estos cambios son propios de cada variedad ya que van asociados al grosor de la pared celular así como a la composición de la misma (Brummell *et al.* 2004).

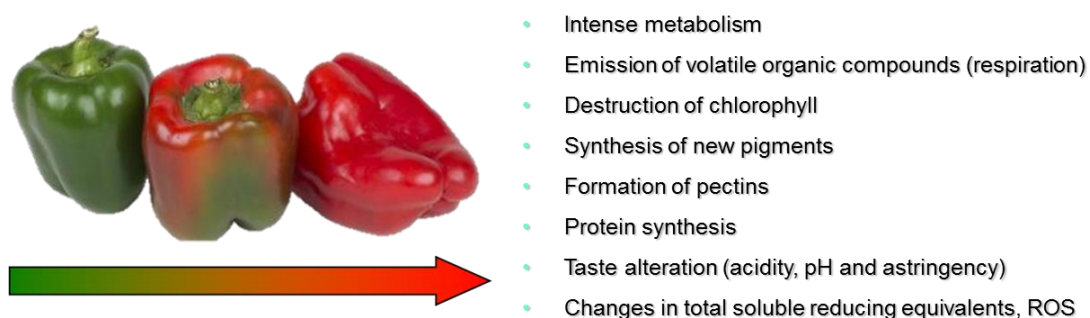


Figure 5. Events which take place during ripening of pepper fruits. (Palma *et al.* 2011b)

El proceso de la maduración está influenciado tanto por factores externos (las condiciones medioambientales y los factores bióticos) como por factores internos; y siempre va a estar condicionado por el tipo de fruto, ya sea climatérico o no.

Los frutos climatéricos son aquellos en los que, durante la maduración tiene lugar un incremento de etileno, que controla la tasa respiratoria y hace que ésta aumente, lo que está asociado a la pérdida de firmeza de muchos frutos con gran importancia económica como el tomate y el melocotón. Esta fitohormona es crucial en el desarrollo de estos frutos y también en la respuesta de la planta al medio ambiente, ya que los factores ambientales a los que están sometidos los frutos en las fases de transporte, almacenaje o post-cosecha influyen en la biosíntesis del etileno.

Por otro lado, los frutos no climatéricos, como es el pimiento, los cítricos o la fresa, son aquellos independientes de la producción de etileno y por lo tanto la respiración se mantiene invariable. Este comportamiento no está relacionado con la clasificación taxonómica y es independiente de cada especie. De ahí, que especies como el tomate y el pimiento que pertenecen a la misma familia presenten respuestas diferentes al etileno (Palma *et al.* 2011b).

Los frutos maduros, climatéricos o no, con el tiempo comienzan un proceso conocido como senescencia. Este proceso natural degenerativo es un factor esencial en la post-cosecha de muchos frutos. El proceso de post-cosecha de los frutos puede variar desde varios meses a unos pocos días, y está influenciado por diversos factores internos y externos (Tian *et al.* 2013; Perotti *et al.* 2014).

El pimiento, como otras hortalizas destinadas al consumo humano y debido a los periodos que transcurren entre la cosecha y el consumo, ha de someterse a tratamientos y procesos de almacenamiento para mantener intactas sus propiedades organolépticas. Una de las claves esenciales en el manejo de frutos frescos se basa en las estrategias aplicadas para el almacenamiento y transporte desde que son recolectados hasta que son comercializados. Durante el proceso de post-cosecha, los frutos están sujetos a importantes pérdidas de agua y daños por frío, afectando todo esto a las propiedades nutricionales por las cuales son valorados (Banaras *et al.* 2005; Smith *et al.* 2006; Cuadra-Crespo & del Amor 2010). Por ello, las estrategias de post-cosecha deben asegurar la adecuada conservación de las cualidades de los frutos, como el aroma, el sabor, la turgencia, el color o su poder nutricional debido a que no sólo afectan a la calidad del fruto sino también a los beneficios económicos de los productores y del mercado.

Debido al alto valor nutricional del pimiento y su importancia comercial, a lo largo de los años se han estudiado estrategias de conservación que permitan mantener la calidad del fruto y prolonguen el tiempo de almacenamiento (Raffo *et al.* 2007, 2008; Morgado *et al.* 2008; Sabularse *et al.* 2009). Se ha observado cómo el tiempo de almacenamiento de los pimientos dulces, comúnmente consumidos en España, se incrementaba en atmósferas controladas con baja concentración de oxígeno y altos niveles de dióxido de carbono (Howard & Hernandez-Brenes 1998). Atmósferas con bajos niveles de oxígeno retardan la maduración y la respiración durante los periodos de almacenamiento y transporte. También se ha comprobado cómo la maduración del pimiento puede ser atenuada o acelerada bajo ciertas condiciones, al ser expuesto a ciertas sustancias. La exposición a atmósferas carentes de oxígeno, con exceso de CO₂ y con la presencia de inhibidores de la respiración, paraba el proceso de la maduración, y modificaba el sabor de los frutos debido a los procesos enzimáticos que tenían lugar. Por el contrario, altos niveles de O₂ pueden estimular la maduración. Igualmente este proceso puede ser acelerado en tratamientos post-cosecha por el uso de sustancias como el “Etefón” que regula el crecimiento vegetal y acelera la maduración o el “Azetil” que es una mezcla de dos gases, etileno y nitrógeno (Giambanco de Ena 2006). De forma similar, se ha demostrado que el etileno es efectivo en los tratamientos post-cosecha para acelerar los cambios de color (Fox *et al.* 2005). El peróxido de hidrógeno, aplicado en etapas de post-cosecha, puede mejorar la calidad de los frutos de *Capsicum* (Bayoumi 2008). Asimismo, recientemente nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la maduración de los frutos de pimiento está también modulada por el óxido nítrico (NO) (Chaki *et al.* 2015).

Los frutos de pimiento, como en otros muchos cultivos, durante los procesos de almacenamiento sufren pérdidas de color. Estas pérdidas comienzan con la degradación de vitaminas como la C y continúa con la degradación de los carotenoides debido a la oxidación por especies de oxígeno reactivo (ROS). Durante los últimos años se han realizado estudios sobre cambios en antioxidantes como ascorbato, carotenoides, compuestos fenólicos, enzimas antioxidantes y capacidad antioxidante total en pimiento, bajo diferentes condiciones de almacenamiento y post-cosecha (Jiménez *et al.* 2003; Raffo *et al.* 2007; 2008). Sin embargo, el desarrollo de unas condiciones “óptimas” de almacenamiento así como un análisis exhaustivo donde se incluyan los

principales antioxidantes se hace necesario para poder tener una visión clara de cómo la fisiología del fruto es afectada por el proceso de post-cosecha.

5. Metabolismo de las especies de oxígeno reactivo (ROS) y sistemas antioxidantes

5.1. Especies de oxígeno reactivo (ROS)

La necesidad del O_2 por parte de los organismos aerobios lleva asociada la generación de ROS y, por tanto su posible toxicidad ha hecho que los organismos aerobios desarrollen a su vez un sistema complejo de defensa y control frente a los efectos no deseados derivados de la reactividad del oxígeno.

El término especies de oxígeno reactivo (ROS) incluye moléculas radicales y no radicales formadas en las etapas de reducción completa del O_2 hasta agua (Fig. 6) (Halliwell 2007; Corpas *et al.* 2015a; Mittler 2017). Estas ROS pueden ser producto de la actividad metabólica normal o consecuencia de las distintas perturbaciones medioambientales.

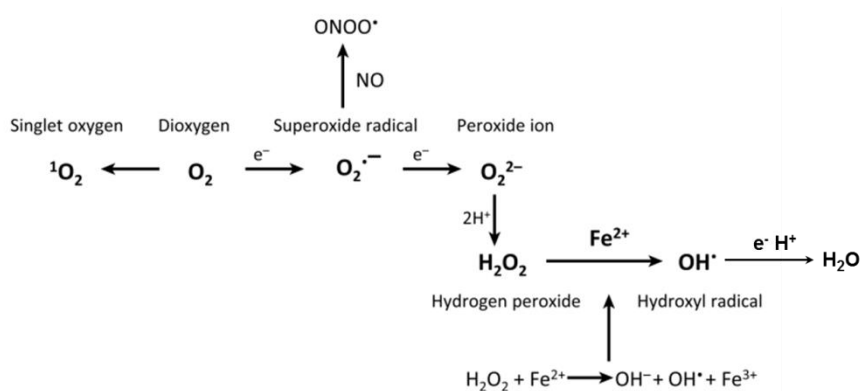


Figure 6. Formation of different ROS from oxygen reduction. Scheme from Mittler (2017).

Las principales ROS son: anión **superóxido** ($O_2^{\bullet -}$), **radical hidroxilo** ($\bullet OH$) y **peroxilo** (ROO^\bullet) como moléculas radicales, y **peróxido de hidrogeno** (H_2O_2), **oxígeno singlete** (1O_2) y **ozono** (O_3) como no radicales. En condiciones fisiológicas óptimas, estas moléculas son producidas en numerosas rutas metabólicas, siendo las cadenas transportadoras de electrones presente en cloroplastos y mitocondrias las fuentes

principales de ROS (Halliwell 2006; del Río 2015), aunque también son producidas en los peroxisomas y por la acción enzimática de diversas oxidasas.

Como moléculas señalizadoras, las ROS son altamente versátiles debido a sus diversas propiedades que incluye los diferentes lugares de producción, los diferentes niveles de reactividad y su capacidad para atravesar o no las membranas biológicas (Mittler 2017). En la tabla 2 se muestran algunas de las características química y celulares de estas ROS.

En plantas, el H_2O_2 es generado de forma natural pero también en respuesta a diferentes estreses tanto bióticos como abióticos. La membrana plasmática, la β -oxidación de ácidos grasos y la fotorespiración son las principales fuentes de H_2O_2 en células vegetales. Aunque las reacciones de fotooxidación y la NADPH oxidasa (NOX) también contribuyen a la formación de esta ROS (Sharma *et al.* 2012; Corpas *et al.* 2015a; del Río 2015). El H_2O_2 es una especie que tiene relativa facilidad para atravesar las membranas, por lo que el daño oxidativo que ocasiona puede darse en lugares relativamente alejados del sitio donde se generó. Esta facilidad para difundir en el interior de la célula la hace tener un papel importante como molécula señal, ya que puede activar genes de defensa en las plantas, incluyendo los relacionados con la muerte celular programada (PCD) (Corpas 2015). Entre las causas de su toxicidad biológica, está su capacidad de reaccionar con los grupos $-\text{SH}$, y la formación del radical hidroxilo tras su reacción con el radical superóxido en presencia de metales (Halliwell 2007; Gill & Tuteja 2010).

Entre las fuentes enzimáticas de generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$, está la xantina oxidasa (XOD) implicada en el metabolismo de purinas (Corpas *et al.* 2008b) y el análogo en plantas a la NADH oxidasa (NOX) que está unida a la membrana plasmática, designada como proteína homóloga de la oxidasa de la explosiva respiratoria o “respiratory burst oxidase homologue” (RBOH). Esta enzima está codificada en plantas por una familia multigénica con 10 miembros en *Arabidopsis* (RBOHA-RBOHJ) y 9 en arroz (Sagi & Fluhr 2006; O'Brien *et al.* 2012). Pero hay otras fuentes como los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas que contribuyen a la formación de esta ROS. Esta molécula es inestable en solución acuosa y con una vida media muy corta (Asada 2006; del Río *et al.* 2006; Halliwell 2007; del Río 2013). Este radical es capaz de reaccionar con NO produciendo peroxinitrito (ONOO^-), que es una molécula con gran capacidad

oxidante. Entre los efectos más tóxicos del $O_2^{\cdot-}$ está la reacción con el H_2O_2 en presencia de metales como Fe o Cu tal y como se ha mencionado anteriormente, llevándose a cabo la reacción Haber-Weiss donde se produce el radical hidroxilo ($\cdot OH$), que es uno de los oxidantes más potentes conocidos. Este último tiene una vida media muy corta y puede reaccionar con proteínas, ácidos nucleicos, lípidos de membrana y otras moléculas orgánicas (Gutteridge & Halliwell 2000) (Tabla 2).

El oxígeno singlete (1O_2) es otra de las especies de oxígeno reactivo más oxidantes, y es la forma excitada no radical del oxígeno. Se puede producir bajo alta iluminación, en concreto en el fotosistema II, dando lugar a reacciones de fotosensibilización. Esta energía de excitación se transmite al O_2 , formándose el 1O_2 (Gutteridge & Halliwell 2000).

Table 2. Reactivity (mode of action), production systems and scavenging of ROS in plant cells. APX, ascorbate peroxidase; CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase; GPX, glutathione peroxidase; PER, peroxidase; PRX, peroxiredoxin; RBOH, respiratory burst oxidase homolog. Modified from (Mittler 2017). Compiling data of the table were reported by Halliwell 2007; Mittler *et al.* 2011; König *et al.* 2012; Foyer & Noctor 2013; Vaahtera *et al.* 2014 and Mignolet-Spruyt *et al.* 2016.

ROS	Mode of action	Production site	Scavenging systems
Superoxide ($O_2^{\cdot-}$)	Reacts with Fe-S proteins Dismutates to H_2O_2	Apoplast (RBOHs), chloroplasts, mitochondria, peroxisomes, electron transfer chains	SOD, flavonoids, ascorbate...
Hydroxyl radical ($OH\cdot$)	Extremely reactive with all biomolecules including DNA, RNA, lipids, and proteins	Iron and H_2O_2 (Fenton reaction)	Flavonoids, proline, sugars, ascorbate,...
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Reacts with proteins by attacking cysteine and methionine residues. Reacts with heme proteins. Reacts with DNA.	Peroxisomes, chloroplasts, mitochondria, cytosol, apoplast	APX, CAT, GPX, PER, PRX, ascorbate, glutathione,...
Singlet oxygen (1O_2)	Oxidizes lipids, proteins (Trp, His, Tyr, Met, and Cys residues), and G residues of DNA	Membranes, chloroplasts, nuclei	Carotenoids and α -tocopherol

Actualmente, se sabe que las ROS son además un componente esencial en la red de señalización de las plantas que promueve su crecimiento y que actúa frente a los cambios ambientales a los cuales se ven sometidas. La gran variedad de los sistemas

antioxidantes presentes en las células vegetales ha permitido regular el contenido de estas ROS y así poder ser usadas como transductores de señales (Mittler *et al.* 2011).

Las ROS tienen un papel importante en procesos biológicos como el crecimiento, desarrollo, respuesta a estreses bióticos y a estímulos medioambientales, en el metabolismo de la planta y en la activación de la muerte celular programada (Fig. 7) (Gill & Tuteja 2010; Mittler *et al.* 2011; del Río 2015; Mittler 2017).

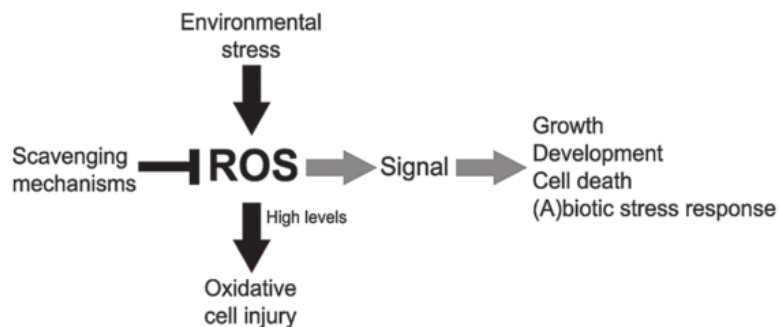


Figure 7. Role of ROS. Environmental stress conditions induce over-production of ROS which can produce oxidative damage. Nevertheless, plants have an antioxidant system that allows ROS to be used as a signal in distinct biological processes, such as growth and development, responses to biotic and abiotic stresses, and programmed cell death (PCD). Reproduced from Vanderauwera et al. (2009).

El proceso en el cual se da la producción de ROS como subproducto del metabolismo aeróbico, unido a la detoxificación o eliminación de estas ROS por mecanismos celulares antioxidantes, se produce constantemente en la célula con el fin de prevenir el daño oxidativo, siendo el objetivo de los sistemas antioxidantes el de mantener las ROS a niveles basales no tóxicos (Fig.8).

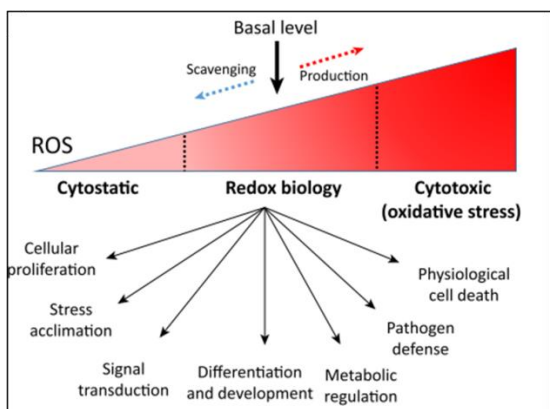


Figure 8. Effects of ROS on the regulation of different cellular processes. When the ROS levels are low they can be cytostatic for cells, whereas if ROS levels are too high are cytotoxic. For this reason the balance between ROS production and ROS scavenging is required for proper ROS and redox signalling in cells. Taken from Mittler 2017.

5.2. Sistemas antioxidantes

Las plantas poseen un complejo sistema de defensa antioxidante, compuesto por sistemas enzimáticos y no enzimáticos encargados de mantener los niveles adecuados de ROS. A continuación, se hará una breve descripción de los más relevantes en plantas.

5.2.1. Antioxidantes enzimáticos

Los sistemas antioxidantes enzimáticos en plantas están compuestos por enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la familia de las peroxidasas (peroxirredoxinas, glutatión peroxidasas, tioredoxina peroxidasas, etc.), enzimas del ciclo ascorbato-glutatión (AsA-GSH) como la ascorbato peroxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MDAR), la deshidroascorbato reductasa (DHAR) y la glutatión reductasa (GR). Estas enzimas actúan en diferentes compartimentos subcelulares respondiendo conjuntamente cuando la célula está expuesta a estrés oxidativo (Tabla. 3).

Table 3. Major ROS scavenging antioxidant enzymes (Gill & Tuteja 2010).

Enzymatic antioxidants	Enzyme code	Reactions catalyzed
Superoxide dismutase (SOD)	EC 1.15.1.1	$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$
Catalase (CAT)	EC 1.11.1.6	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2}O_2$
Ascorbate peroxidase (APX)	EC 1.11.1.11	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$
Guaicol peroxidase (GPX)	EC 1.11.1.7	$H_2O_2 + GSH \rightarrow H_2O + GSSG$
Monodehydroascorbate reductase (MDAR)	EC 1.6.5.4	$MDHA + NAD(P)H \rightarrow AA + NAD(P)^+$
Dehydroascorbate reductase (DHAR)	EC 1.8.5.1	$DHA + 2GSH \rightarrow AA + GSSG$
Glutathione reductase (GR)	EC 1.6.4.2	$GSSG + NAD(P)H \rightarrow 2GSH + NAD(P)^+$

❖ Superóxido dismutasa (SOD EC 1.15.1.1)

Las enzimas superóxido dismutasas (SODs) son consideradas uno de los sistemas antioxidantes enzimáticos más efectivos y son la primera defensa frente a los efectos tóxicos del radical superóxido. Mientras que enzimas como la catalasa y algunas peroxidasas se encargan de eliminar el peróxido de hidrógeno, las SODs son las únicas encargadas de eliminar el radical superóxido $O_2^{\bullet-}$ (Gill & Tuteja 2010; Sharma *et al.* 2012; Palma *et al.* 2013). Las SODs son una clase de metaloenzimas con diferente naturaleza según el metal localizado en su centro activo. En base a esto podemos diferenciar tres tipos de SODs: las cupro/zinc (CuZn-SOD), las manganeso (Mn-SOD)

y las ferro (Fe-SOD) superóxido dismutasas, todas ellas localizadas en diferentes compartimentos celulares (Palma *et al.* 2013).

El número y tipo de las SODs varía en función de la especie, órgano, etapa de crecimiento y de las condiciones ambientales (Corpas *et al.* 2006a). La sobreexpresión de las SODs y el aumento de su actividad está generalmente relacionada con la defensa de las plantas frente a un estrés oxidativo generado tanto por estreses bióticos como abióticos, y juega un papel crucial en la homeostasis celular bajo estas condiciones (Gill & Tuteja 2010). Se han descrito aumentos de la actividad SOD en plantas que han sido relacionados con tolerancia de las plantas frente a diferentes estreses medioambientales (Sharma *et al.* 2012). Se ha estudiado asimismo la modulación de estas enzimas frente a diferentes tipos de estrés, tanto abióticos como bióticos. Por ejemplo, en la planta halofita *Cakile marítima*, se ha observado la inducción de varias isoenzimas CuZn-SOD ante altas concentraciones de NaCl (400 mM) (Houmani *et al.* 2016). Comportamientos similares se han observado en distintas especies vegetales frente a sequía, metales pesados o temperaturas extremas, donde se ha descrito la inducción o inhibición de algunas de las diferentes isoenzimas de SOD (Airaki *et al.* 2012; Mateos *et al.* 2013). También, se ha descrito la modulación de las SODs durante diferentes etapas del desarrollo de las plantas como la senescencia (del Río *et al.* 2003a) y han sido caracterizadas en diferentes especies vegetales y orgánulos celulares (Palma *et al.* 1998; Corpas *et al.* 2006a; Rodríguez-Serrano *et al.* 2007).

La importancia y características de esta metaloenzima han sido desarrollada de una forma más exhaustiva en el Capítulo 2 de esta Tesis Doctoral.

❖ **Catalasa (CAT EC 1.11.1.6)**

Es una hemoproteína tetramérica que oscila entre los 220-240 kDa de tamaño, localizada exclusivamente en los peroxisomas. Se encarga de eliminar el H₂O₂ que es generado en dichos orgánulos como consecuencia de su propio metabolismo, o el derivado de otros (Corpas *et al.* 1999; Halliwell 2007). En plantas la catalasa es codificada por una familia multigénica lo cual indica la complejidad funcional que puede tener esta enzima, por ejemplo durante el desarrollo post-germinativo o en respuesta a distintos estreses (Ni & Trelease 1991a, 1991b; Frugoli *et al.* 1996; Mhamdi *et al.* 2010, 2012; Corpas 2015; Corpas *et al.* 2017).

Debido a la importancia de esta enzima antioxidante como reguladora de los niveles de H_2O_2 y como molécula señal, en pimiento se han realizados algunos estudios del comportamiento de dicha enzima frente a diferentes situaciones que incluyen el estrés medioambiental o los cambios de temperatura (Airaki *et al.* 2012; Mateos *et al.* 2013), y durante los distintos estadios del desarrollo de las plántulas de pimiento o la maduración de sus frutos (Mateos *et al.* 2003; Airaki *et al.* 2015; Chaki *et al.* 2015).

En el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral se realiza una caracterización detallada de esta enzima antioxidante, donde se desarrolla su importancia metabólica y parte de su características bioquímicas.

❖ **Guayacol peroxidasa (GPX; EC 1.11.1.7)**

Pertenece al amplio grupo de las peroxidases. Es una hemoproteína que se encuentra ampliamente distribuida en animales, plantas y microbios. Esta enzima presenta cuatro puentes disulfuro conservados y contiene dos iones estructurales de Ca^{+2} . Puede encontrarse en orgánulos como las vacuolas, y también están presentes en la pared celular y en el citosol. Entre los procesos a los que se vincula a las GPX, se encuentran la lignificación de la pared celular y biosíntesis de etileno (Sharma *et al.* 2012)

Enzimas del ciclo ascorbato-glutación (AsA-GSH)

Este ciclo también denominado ciclo Foyer-Halliwell-Asada es uno de los principales sistemas antioxidantes exclusivo de plantas y encargado de mantener los niveles de H_2O_2 . Este ciclo se encuentra en, al menos, 4 compartimentos subcelulares, el citosol, los cloroplastos, los peroxisomas y las mitocondrias (Jiménez *et al.* 1997). Forman parte de este ciclo las enzimas ascorbato peroxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MDAR), la deshidroascorbato reductasa (DAR), y la glutación reductasa (GR). Además en este ciclo participan el ascorbato y el glutación que, al ser oxidados, dan lugar a monodeshidroascorbato (MDA) y deshidroascorbato (DA), y glutación oxidado (GSSG), respectivamente. Para el funcionamiento del ciclo es necesaria la presencia de NADPH, coenzima ubicuo con capacidad reductora debido a su potencial redox (Fig. 9) (Halliwell & Foyer 1976; Foyer *et al.* 1997).

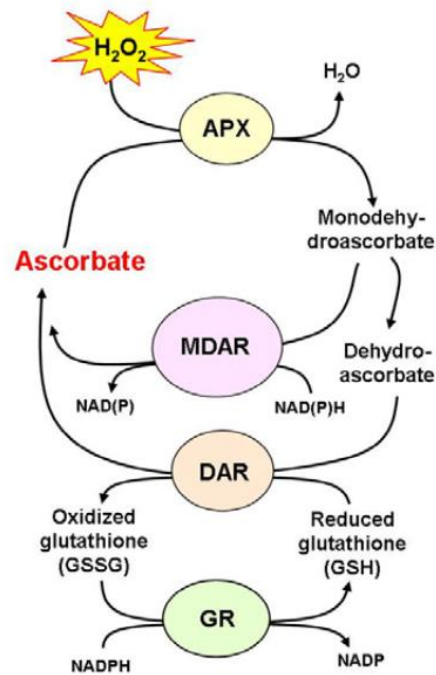


Figure 9. Ascorbate-glutathione cycle (AsA-GSH). Hydrogen peroxide is removed by ascorbate peroxidase (APX) in presence of ascorbate with the final consumption of reducing power as NADPH. MDAR, monodehydroascorbate reductase; DAR, deshydroascorbate reductase; GR, glutathione reductase. Taken from Palma *et al.* (2011a).

❖ **Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)**

Es la primera enzima del ciclo ascorbato-glutación (AsA-GSH), se encarga de reducir el H_2O_2 a H_2O empleando al ascorbato como sustrato reductor y generando MDA. Es una hemoperoxidasa cuyo número y distribución de isoenzimas varía en función de la especie vegetal. En plantas superiores ha sido localizada en el citosol, el estroma, los tilacoides, las mitocondrias y los peroxisomas (Bunkelmann J.R 1996; Shigeoka *et al.* 2002; del Río *et al.* 2003a; Palma *et al.* 2013).

Es considerada una de las enzimas más ampliamente distribuida en células vegetales, con una afinidad por el H_2O_2 mayor que la de la catalasa, por lo que se la considera un eficiente antioxidante en situaciones de estrés (Sharma *et al.* 2012). Es una enzima que ha destacado en procesos de estrés fotooxidativo o de alta temperatura, pero que también tiene relevancia en procesos mediados por metales pesados (Yabuta *et al.* 2000; Palma *et al.* 2013) o estrés salino (Gómez *et al.* 2004; Begara-Morales *et al.* 2014)

❖ **Monodeshidroascorbato reductasa (MDAR; EC 1.6.5.4)**

Esta enzima cataliza la reducción de MDA a ascorbato usando NAD(P)H como donador de electrones. Es una flavoproteína (FAD) presente en cloroplastos (Hossain & Asada 1984), en el citosol (Dalton *et al.* 1993), mitocondria y peroxisomas (Jiménez *et al.* 1997; López-Huertas *et al.* 1999; Leterrier *et al.* 2005; Lisenbee *et al.* 2005; Gest *et al.* 2013a). Se ha descrito cómo esta enzima en el cloroplasto podría tener dos funciones: por un lado la regeneración de AsA a través del MDA y por otro la mediación de la fotoreducción del O_2 a O_2^- cuando no tiene MDA como sustrato (Miyake *et al.* 1998). Frente a estreses como alta intensidad lumínica, metales pesados o radiación UV-B se ha observado que la MDAR es modulada aumentando su actividad (Leterrier *et al.* 2005; Shin *et al.* 2013).

❖ **Deshidroascorbato reductasa (DAR; EC 1.8.5.1)**

Es una enzima clave en el ciclo AsA-GSH ya que mantiene los niveles adecuados de ascorbato y actúa como oxidante (Tang & Yang 2013). Cataliza la reducción del deshidroascorbato a AsA usando glutatión reducido (GSH) como sustrato (Hossain & Asada 1984). Se ha descrito la activación de esta enzima en respuesta a varios tipos de estrés, como la salinidad, sequía, ozono, etc (Shin *et al.* 2013). Se localiza en mitocondria, cloroplastos, citosol y peroxisomas, aunque también se ha descrito la presencia de una enzima citoplasmática en arroz (Jiménez *et al.* 1997; Kim *et al.* 2013).

❖ **Glutatión reductasa (GR 1.6.4.2)**

Es una flavoproteína encargada de catalizar la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), utilizando NADPH como donador de electrones (Halliwell 2007). Esta enzima está localizada a nivel subcelular en cloroplastos, citosol, mitocondrias y peroxisomas (Edwards *et al.* 1990; Jiménez *et al.* 1997; Romero-Puertas *et al.* 2006). En la mayoría de las plantas su tamaño molecular es de 100-150 kDa y contiene un FAD por monómero (Romero-Puertas *et al.* 2006; Gill *et al.* 2013). Tienen un papel esencial en la detoxificación de ROS y en la tolerancia frente a determinados tipos de estrés, tales como salinidad, sequía y otros (Gill *et al.* 2013).

5.2.2. Antioxidantes no enzimáticos

❖ **Ácido ascórbico**

El ascorbato (ácido ascórbico o vitamina C) es uno de los antioxidantes no enzimáticos más importantes en células vegetales (DeBolt *et al.* 2007; Foyer & Noctor 2011) y que no puede ser sintetizado por los humanos (Palma *et al.* 2011a; Alós *et al.* 2013). Esto hace que deba ser incorporado a nuestro organismo a través de nuestra dieta, que ha de contener frutas y verduras. En este sentido, el pimiento es una de las fuentes de vitamina C más ricas del mundo vegetal, presentando valores en fruto tanto verde como rojo de entre 92-105 mg/ 100 g de peso fresco, por lo que la ingesta de 50-100 g de pimiento en fresco nos aportaría casi el 100% de las cantidades diarias de vitamina C recomendada.

Sin embargo, la concentración de ascorbato en plantas varía entre especies e incluso entre variedades de la misma especie y entre tejidos de la misma planta (Gest *et al.* 2013b), siendo esta variabilidad influenciada por diferentes factores tanto internos como externos. Este antioxidante está presente en diferentes compartimentos subcelulares y es esencial para el metabolismo celular. En células vegetales se encuentra tanto en su forma reducida como en sus dos formas oxidadas, el deshidroascorbato (DA) y el monodeshidroascorbato (MDA) (Halliwell 2007).

• **Biosíntesis, regeneración y degradación del AsA en plantas**

La ruta más consensuada relacionada con la **síntesis** de ascorbato y de la que se tiene más información es la ruta de la **L-Galactosa (L-Gal)**. Esta ruta comienza a partir de la glucosa seguida de 10 reacciones que tienen como final la oxidación de la L-galactono-1,4-lactona (GalL) a ácido ascórbico (Fig. 10). Las primeras reacciones que tiene lugar en esta ruta se comparten con aquellas relacionadas con la formación de azúcares que forman parte de la pared celular (Valpuesta & Botella 2004). El último metabolito común en estas dos rutas es la GDP-L-galactosa formada por la epimerización de la GDP-manosa, en una reacción catalizada por la GDP-D-manosa-3,5-epimerasa (GME). Los siguientes pasos son considerados exclusivos en la síntesis de AsA (Linster *et al.* 2007). Entre ellos, encontramos la formación de la galactosa-1-fosfato a través de la GDP-L-galactosa fosforilasa (GGP, VTC2/VTC5). Una vez formada la L-Gal-1-P es desfosforilada por la L-Gal-1-P fosfatasa (GPP, VTC4). La siguiente reacción requiere la actividad de la L-Gal deshidrogenasa (L-GalDH) la cual forma L-galactono-1,4-lactona (L-GalL) que finalmente es oxidada por la enzima L-galactono-1,4-lactona

deshidrogenasa (GalLDH; EC 1.3.2.3) para la producción de AsA. Dicha reacción no va asociada a ninguna coenzima por lo que los electrones de la GalL se transfieren directamente al citocromo *c* localizado en la membrana mitocondrial interna (Wheeler *et al.* 1998; Bartoli *et al.* 2000; Millar *et al.* 2003; Hervás *et al.* 2013; Szarka *et al.* 2013; Bartoli *et al.* 2016).

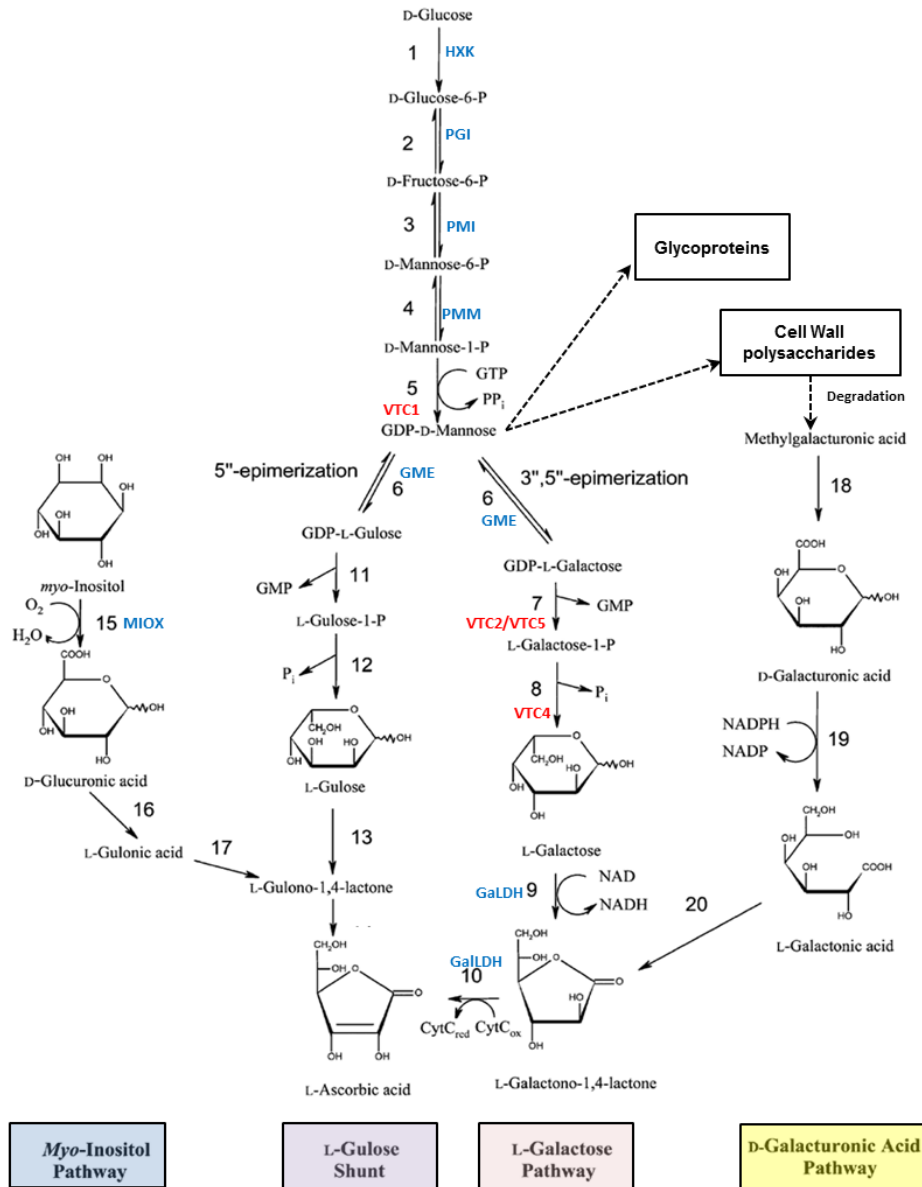


Figure 10. Ascorbic acid biosynthesis pathways in plants. Reactions are catalyzed by: **1.** Hexokinase; **2.** Phosphoglucose isomerase; **3.** Phosphomannose isomerase; **4.** Phosphomannose mutase; **5.** GDP-D-mannose pyrophosphorylase; **6.** GDP-D-mannose-3,5-epimerase; **7.** GDP-L-galactose-pyrophosphatase; **8.** L-galactose-1-phosphate dehydrogenase; **9.** L-galactose dehydrogenase; **10.** L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase; **11.** *GDP-L-gulose pyrophosphatase*; **12.** *L-gulose-1-phosphate phosphatase*; **13.** L-gulose dehydrogenase; **14.** L-gulono-1,4-lactone dehydrogenase; **15.** Myo-inositol oxidase; **16.** Glucuronic acid reductase; **17.** Aldonolactonase; **18.** Pectin methyltransferase; **19.** Galacturonic acid reductase; **20.** *Aldonolactonase*. Enzymes in italics have not been demonstrated in plants. (Hancock & Viola 2005; Linster & Clarke 2008).

Wolucka and Van Montagu (2007) propusieron un ciclo extendido VTC2 que participaría en la síntesis de ascorbato sin la necesidad de la actividad fosfomanosa isomerasa (PMI) (Fig.11). Este ciclo requiere la presencia de una 2'-epimerasa aún no identificada que convierte la GDP-D-glucosa en GDP-D-manosa. En este proceso los productos de la fotosíntesis pasarían directamente a este ciclo extendido VTC2 sin la necesidad de actividad PMI. Este ciclo, además de generar L-galactosa-1-P destinada a la síntesis de ascorbato, también generarían GDP-hexosas destinadas a síntesis de polisacáridos y glicoproteínas (Linster & Clarke 2008).

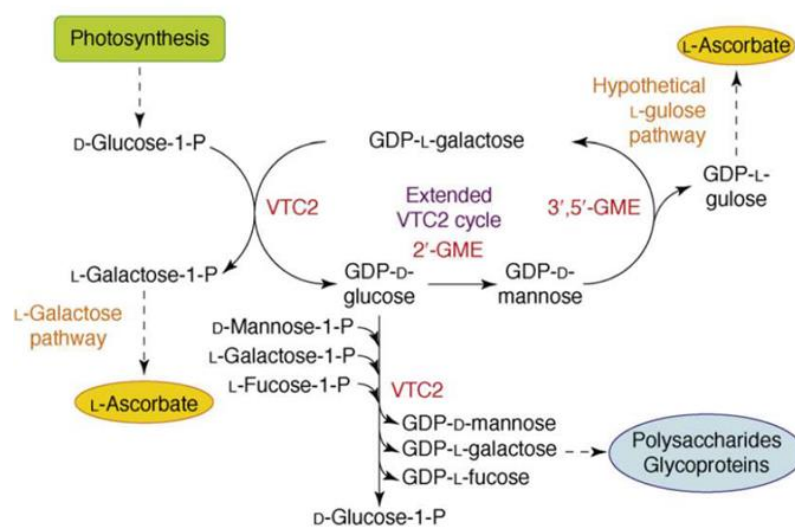


Figure 11. The extended VTC2 cycle proposed by Wolucka and Van Montagu (2007). This cycle involves an additional putative enzyme that interconverts GDP-D-glucose and GDP-D-mannose (2'-GME) (Linster & Clarke 2008).

Otra de las rutas precursoras del AsA es la de ácido **D-galacturónico (D-GalUA)** derivado de las pectinas de la pared celular. En esta ruta, el D-GalUA es transformado a través de varias reacciones a AsA (Agius *et al.* 2003) (Fig.10). La participación de esta ruta fue observada particularmente durante los últimos estados de la maduración de frutos (Badejo *et al.* 2012). Tanto la ruta de la L-Gal como ésta última convergen en el último paso donde tiene lugar la reacción catalizada por la GalLDH (Bartoli *et al.* 2016).

La tercera ruta propuesta es a través de la oxidación del **mio-inositol** donde se producen una serie de metabolitos que finalmente dan lugar a la síntesis de AsA; la sobreexpresión de la mio-inositol oxigenasa (MIOX) aumenta los niveles de AsA en

hojas y frutos (Fig.10) (Lorence *et al.* 2004; Endres & Tenhaken 2009; Cronje *et al.* 2012). Asimismo, se ha propuesto una ruta alternativa a través de la **GDP-L-gulosa (GDP-L-Gul)**, un metabolito relacionado directamente con la síntesis de AsA (Wolucka & Van Montagu 2003), aunque su contribución en el contenido total de ascorbato no es muy significativo (Fig.10) (Bartoli *et al.* 2016).

Considerando la función redox del ascorbato en el metabolismo de las plantas, el equilibrio entre sus formas oxidadas y la reducida es crucial.

La **oxidación** del ascorbato en las células vegetales puede darse de forma directa a través de la reacción con ROS. La destoxicación de las ROS mediada por AsA puede darse por enzimas como la APX, encargada de la reducción del H₂O₂ a agua, con la oxidación de MDA, como ya se ha comentado anteriormente. Algunas dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato requieren de AsA como donador electrónico para mantener el estado reducido de los iones metálicos de sus grupos prostéticos (Arrigoni & De Tullio 2000). Muchas de las dioxigenasas que requieren AsA catalizan reacciones metabólicas importantes como la hidroxilación de residuos de prolina en glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), siendo éstas proteínas estructurales de las paredes celulares vegetales (Sommer-Knudsen *et al.* 1998), o bien están involucradas en la biosíntesis de reguladores del crecimiento como el etileno, las giberelinas y el ácido abscísico (Hancock & Viola 2005). El AsA puede actuar también como cofactor para otras enzimas, como donador de electrones en los fotosistemas I y II, o puede participar en reacciones de regeneración del α -tocoferol o los flavonoides. Otro mecanismo de oxidación del ascorbato es vía ascorbato oxidasa (AO EC 1.10.3.3) aunque su función no está clara hoy día (De Tullio *et al.* 2004). Todas estas reacciones conllevan al final a la formación de monodeshidroascorbato (MDA) y deshidroascorbato (DA). Este último puede finalmente descomponerse por hidrólisis en 2,3-diceto-L-gulonic-acid (2,3 DKG) o ser catalizado directamente a oxalato y tartrato (Hancock & Viola 2005).

Como otras especies que requieren de ascorbato, las plantas disponen de mecanismos enzimáticos para reciclar la forma oxidada de este compuesto y recobrar su estado reducido. En este sentido, el mecanismo de reciclaje o recirculación más importante en células vegetales es el ciclo ascorbato-glutatión que ya se explicó anteriormente (AsA-GSH).

La transformación de ascorbato y DHA en plantas da lugar a una serie de productos finales como el L-treonato, oxalato y L-tartrato (Fig.12). Los primeros estudios realizados acerca del catabolismo del ascorbato en plantas fueron de la mano de Loewus y colaboradores (Loewus 1999). En plantas, la producción de oxalato a partir de ascorbato conlleva la degradación del esqueleto de carbono entre el C2 y C3 siendo ésta una de las rutas de degradación identificadas. Esta división da lugar al oxalato y a L-treonato. La ruta de degradación de ascorbato hasta oxalato y treonato vía apoplasto fue propuesta por Green and Fry (2005). Esta ruta implica la formación de 4-*O*-oxaly-L-threonate. La hidrólisis de este compuesto, tanto de forma enzimática como de forma no enzimática es la que da lugar a la formación de los compuestos de degradación de ascorbato anteriormente mencionados (Smirnoff 2011).

La otra ruta de degradación implica la formación final de tartrato, siendo una ruta que varía en función de las especies vegetales. En uva y otros miembros de la familia *Vitaceae* la degradación hasta tartrato tiene lugar con la división a nivel de C4 y C5; aunque en otras especies como la de los geranios (familia *Geraniaceae*), se sugiere la formación de tartrato a través de la división en C2/C3, dando lugar a oxalato y treonato, y oxidándose este último hasta tartrato (Wagner & Loewus 1973). Sin embargo, aún no existe demasiada información sobre las reacciones y las enzimas implicadas en esta ruta. Tan solo se ha podido identificar una deshidrogenasa como enzima involucrada, la L-idonato deshidrogenasa (IDH), identificada en uva (DeBolt *et al.* 2006, 2007; Smirnoff 2011).

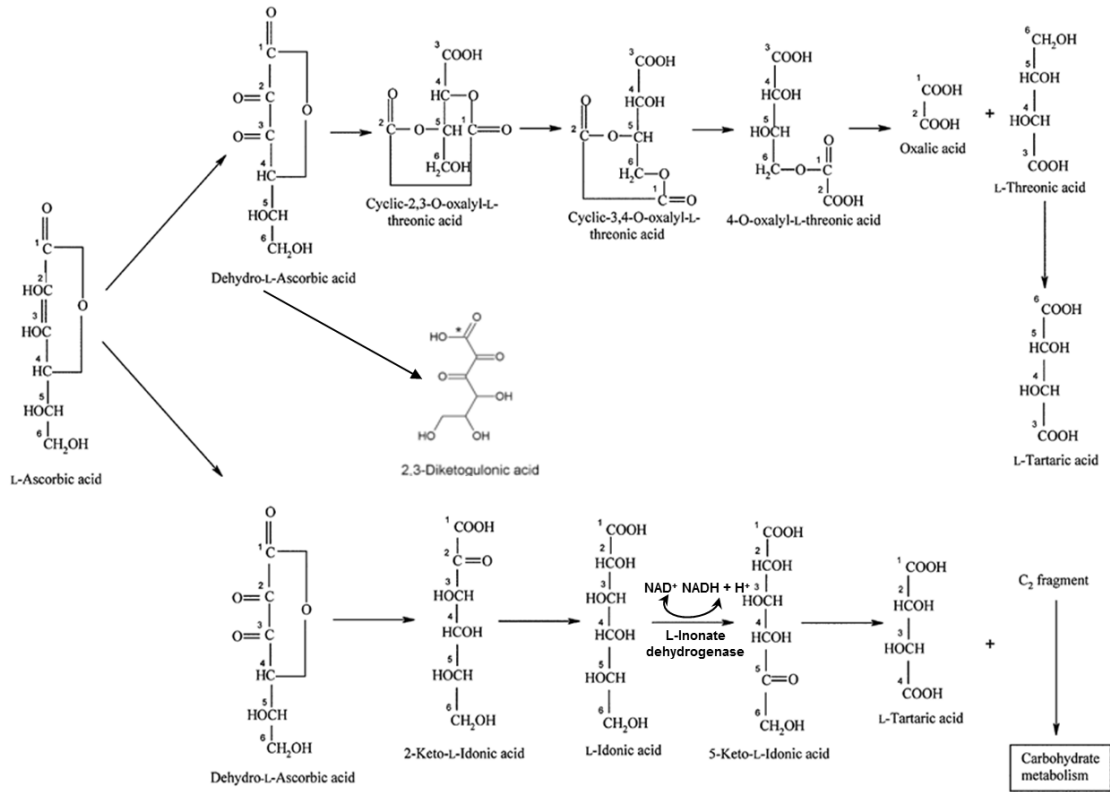


Figure 12. Catabolic pathways of ascorbic acid. Modification of Hancock and Viola (2005) and Smirnov (2011).

- **Función del AsA en plantas**

La principal función del ascorbato es la de actuar como **antioxidante**, protegiendo las células fotosintéticas de las ROS derivadas de los cloroplastos y otros orgánulos (Smirnov 2011). Se destaca su participación en la eliminación de peróxido de hidrogeno de la célula a través de la reacción catalizada por la APX, y también interviene en la eliminación de radicales superóxido, radical hidroxilo y oxígeno singlete (Gill & Tuteja 2010), así como en la regeneración del α -tocoferol, por lo que en este sentido su principal papel es de fotoprotector (Palma *et al.* 2011a; Wheeler *et al.* 2015). Además, juega un papel importante en la prevención de la peroxidación lipídica en las membrana tilacoidales y actúa como cofactor tanto de la violaxantina depoxigenasa (VDE) en el ciclo de las xantofilas, como para otras enzimas implicadas en procesos de hidroxilación donde contribuye en la síntesis de colágeno y en la desmetilación de histonas y ácidos nucleicos (Smirnov 2011; Blaschke *et al.* 2013; Wheeler *et al.* 2015).

Este papel como antioxidante en plantas confiere al ascorbato un papel esencial en la defensa frente al estrés oxidativo, especialmente en tejidos fotosintéticos (Smirnoff & Wheeler 2000; Bartoli *et al.* 2016). Está implicado en procesos importantes tanto dentro como fuera de la célula y se ha descrito su localización en diferentes compartimentos subcelulares, principalmente cloroplastos, mitocondria, peroxisomas y citosol, aunque una parte del ascorbato es transportada al apoplasto donde se puede encontrar en concentraciones milimolares (Horemans *et al.* 2000a; Horemans *et al.* 2000b). Para esto se hace indispensable la existencia de un sistema de transporte a través de la membrana plasmática, donde se han descrito transportadores dependientes de Na^+ (Horemans *et al.* 2000b; Conklin & Barth 2004).

Otra de las funciones esenciales del ascorbato es su participación en mecanismos de **señalización celular**. Interviene asimismo en resistencia frente a patógenos, y también se ha relacionado al ascorbato en procesos de biosíntesis de hormonas, regulando moléculas como las giberelinas, el etileno, el ácido salicílico o el abscísico (Conklin & Barth 2004). Por otro lado se ha descrito que el ASA regula la expresión de genes, división y crecimiento celular, y muerte celular programada, entre otros (Foyer & Noctor 2005a; Bartoli *et al.* 2016).

❖ **Glutación (GSH, γ -glutamil-L-cisteínglicina)**

El glutación (GSH) es un tripéptido de bajo peso molecular constituido por glutamato (Glu), cisteína (Cys) y glicina (Gly), y es representado por la fórmula γ -Glu-Cys-Gly. Se encuentra distribuido por diferentes compartimentos subcelulares como el citosol, cloroplastos, núcleo, mitocondria y peroxisomas, aunque también se ha descrito la presencia de GSH en apoplasto (Mittler & Zilinskas 1991; Jiménez *et al.* 1998; Noctor & Foyer 1998; Foyer & Noctor 2011). En los tejidos se encuentra en concentraciones milimolares principalmente en su forma reducida (GSH) con un grupo tiol libre, aunque también se encuentra su forma oxidada (GSSG) constituida por dos moléculas idénticas unidas por un puente disulfuro.

La presencia de la cisteína, su reactividad química y la elevada solubilidad en agua es lo que le confiere al GSH el ser un metabolito crucial en muchas funciones importantes como el crecimiento, desarrollo y en respuesta a cambios medioambientales (Gill *et al.* 2013). Su principal función es la de actuar como antioxidante en la defensa frente al daño oxidativo causado por las ROS (Gill & Tuteja 2010). En dicho papel

actúa con el ascorbato en el ciclo ascorbato-glutación tanto para eliminar el H_2O_2 intracelular como para regenerar ascorbato a través de la reducción del DHA, por la acción de la DAR (Foyer & Noctor 2011). Es además un potencial secuestrador de oxígeno singlete y radicales superóxido, y está involucrado en procesos como la transducción de señales, protección de grupos tiol (Foyer & Noctor 2005b), así como en destoxificación de xenobióticos, prevención de peroxidación lipídica, transporte de sulfatos, regulación de genes relacionados con la respuesta a estrés medioambiental y al ataque por patógenos y en procesos de crecimiento y desarrollo (Anjum *et al.* 2010; Noctor *et al.* 2012; Gill *et al.* 2013). Todas estas propiedades hacen que el GSH sea considerado un importante regulador homeostático del estado redox celular.

❖ **Carotenoides**

En este término se engloba tanto a los carotenos como las xantofilas. Son moléculas liposolubles sintetizadas tanto en plantas como en microorganismos, capaces de destoxificar varias formas de ROS, y protegiendo junto al ascorbato las membranas fotosintéticas del estrés oxidativo (Hormaetxe *et al.* 2004). En plantas se localizan principalmente en las membranas tilacoidales.

Como antioxidantes, son capaces de eliminar oxígeno singlete y atrapar el exceso de energía de la clorofila en estado triplete (Collins 2001; Sharma *et al.* 2012), protegiendo así a la célula del daño fotooxidativo. Son también precursores de macronutrientes como el retinol o la vitamina A, así como de actuar de moléculas señal relacionadas con el desarrollo de la planta y con la respuesta a estreses bióticos y abióticos (Sharma *et al.* 2012).

A medida que los cloroplastos son transformados en cromoplastos, tiene lugar una disminución de la clorofila y un incremento de los carotenoides, quienes dan un color rojizo o amarillento a hojas, frutos y flores. En plantas, estos pigmentos coloreados atraen a los animales polinizadores alertando de la madurez de los frutos (Hormaetxe *et al.* 2004).

❖ **Flavonoides**

El término flavonoide proviene del latín *flavus*, "amarillo", y con el mismo se identifica una familia de metabolitos secundarios de las plantas con más de 1.500 compuestos, también denominados como "vitamina P". Son del grupo de los polifenoles más

abundantes presentes en la dieta. Tienen su capacidad antioxidante, destacando su capacidad de neutralizar los radicales libre. Se trata de compuestos bioactivos que ayudan a mantener una buena salud y protegen de enfermedades crónicas (Birt & Jeffery 2013). En plantas, se localizan principalmente en vacuolas y cloroplastos y no solo actúan como pigmentos, sino que también tienen funciones como bactericidas. Se ha descrito que los flavonoides ayudan a la eliminación de ROS, protegiendo a las plantas de la acción de numerosos tipos de estrés (Yamasaki *et al.* 1997).

6. Metabolismo del óxido nítrico (NO) y de las especies de nitrógeno reactivo (RNS) en plantas superiores

El **óxido nítrico (NO)** también llamado monóxido de nitrógeno es actualmente una de las moléculas gaseosas más estudiada en células vegetales. Es incoloro y de pequeño tamaño, con una vida media *in vivo* relativamente corta, de menos de 10 s. Es considerado un radical libre debido a que presenta en el átomo de nitrógeno, en su orbital π , un electron desapareado. Durante los últimos años el número de trabajos científicos ha demostrado la relevancia del NO y moléculas derivadas designadas como especies de nitrógeno reactivo (RNS, *reactive nitrogen species*) en la fisiología de las plantas (Corpas & Barroso 2015). Esta molécula presenta una gran capacidad para reaccionar con otras moléculas ya sean inorgánicas como orgánicas, tales como péptidos, proteínas, lípidos, y nucleótidos (Corpas *et al.* 2011).

6.1. Producción de NO en plantas

Uno de los aspectos más estudiados en plantas es acerca de las posible fuentes endógenas de NO en las células. En células animales la fuente endógena de NO viene a manos de una enzima designada óxido nítrico sintasa (NOS) (EC 1.14.13.39) (Moncada *et al.* 1991). Esta enzima cataliza la oxidación dependiente de oxígeno y NADPH, de L-arginina hasta NO y L-citrulina, en una reacción que requiere FAD, FMN, calmodulina y Ca^+ (Alderton *et al.* 2001).

En plantas se han descrito diversos mecanismos tanto enzimáticos como no enzimáticos involucrados en la generación de NO (Tabla. 4) (Gupta *et al.* 2011; Astier & Lindermayr 2012; Corpas 2017). Entre los mecanismos de síntesis enzimáticos encontramos dos posibles rutas. Una de ellas describe la generación enzimática de NO a partir de la **L-arginina** y que estaría mediada por una actividad del tipo de la **óxido**

nítrico sintasa, que requiere de todos los cofactores utilizados por la NOS en animal y siendo el NADPH el donador de electrones (Barroso et al., 1999; Corpas et al., 2004, 2006b, 2009a; Chaki et al 2011a). Sin embargo, actualmente no se ha identificado en plantas el gen que codificaría esta proteína NOS dependiente de L-arginina (Corpas *et al.* 2009a; Gupta *et al.* 2011). En este sentido ha ido apareciendo trabajos que describen a la presencia de una proteína similar a la NOS animal, presente en algas unicelulares que podría apoyar esta vía de generación de NO a partir de arginina (Foresi *et al.* 2010; Foresi *et al.* 2015; Jeandroz *et al.* 2016). Asimismo, se ha propuesto que la actividad NOS en plantas podría ser resultado de la cooperación entre proteínas discretas que juntas pueden generar NO (Corpas & Barroso 2016). Diferentes estudios han relacionado la participación de la actividad NOS dependiente de L-Arg con procesos como el desarrollo (Corpas *et al.* 2006b), germinación de semillas, muerte celular programada, cierre estomático, desarrollo de raíces y respuestas a estreses de tipo abiótico y biótico (Delledonne *et al.* 1998; Bright *et al.* 2006; Besson-Bard *et al.* 2009; De Michele *et al.* 2009; Corpas *et al.* 2011). Asimismo, la L-arginina es un precursor de la biosíntesis de poliaminas, y cierto trabajos sugieren que éstas podrían estar implicadas en la biosíntesis de NO, aunque el mecanismo es desconocido (Tun et al. 2006; Wimalasekera et al. 2011a, 2011b). Muy recientemente se ha propuesto otra posible vía relacionada con los niveles de L-Arg. Así, mediante el uso de mutantes defectivos en la enzima cupro-amino oxidasa 8 (CuAO8) se sugiere que esta enzima participaría en la producción de NO afectando la disponibilidad de L-Arg a través de la modulación de la actividad arginasa (Gross *et al.* 2017).

Table 4. Main sources of NO in plants. Data from Corpas *et al.* (2009); del Río (2011, 2015)

Source	Substrates
<i>Non-enzymatic</i>	
NO ₂	Acid pH (ASC)
<i>Enzymatic</i>	
Nitrate reductase	NO ₂ + NADH
NOS-like activity	L-Arg+NOS cofactors
Peroxidase	Hydroxyurea+H ₂ O ₂
Plasma membrane	NO ₂ +reduced Cyt c
<i>Cell organelles</i>	
Mitochondria	NO ₂
Peroxisomes	L-Arg+NOS cofactors
Chloroplasts	NO ₂ and L-Arg

La otra ruta enzimática implicada en la generación de NO es a través de la enzima **nitrito reductasa (NR)**. La función primaria de esta enzima es la de reducir el nitrato a nitrito que posteriormente producirá NO, en dos reacciones en la que el NADH es el donador de electrones (Yamasaki *et al.* 1999; Rockel *et al.* 2002; Gupta *et al.* 2011). Esta enzima está involucrada en el metabolismo del nitrógeno y se ha aceptado como fuente de NO (Lozano-Juste & Leon 2010; Corpas 2017). Otra fuente enzimática de NO que se ha sugerido en plantas es la nitrito-NO reductasa (Ni-NOR). Esta enzima unida a la membrana plasmática de la raíz de tabaco, cataliza la reducción de nitritos a NO utilizando como donador de electrones el citocromo *c* (Stöhr *et al.* 2001). La reducción del nitrito en la membrana interna mitocondrial daría también como resultado la producción de NO (Gupta *et al.* 2011).

6.2. Funciones del NO en plantas

Independientemente del mecanismo de generación, lo que sí está claro es que las plantas puede generar NO y que éste regula numerosos procesos fisiológicos, tales como, la germinación, el desarrollo post-germinativo, la formación de raíces, maduración de frutos o senescencia (Fig.13) (Lamattina *et al.* 2003; Corpas *et al.* 2004; Shapiro 2005; Corpas *et al.* 2006b; Besson-Bard *et al.* 2008; Domingos *et al.* 2015). Además, el NO participa en los mecanismos de defensa frente a fenómenos de estrés biótico y abiótico (Corpas *et al.* 2008b; Chaki *et al.* 2009a, 2009b; Corpas *et al.* 2011; Corpas & Barroso 2015). Todo ello hace que esta molécula sea de un gran interés no sólo por su implicación en mecanismos básicos de funcionamiento, sino también por sus grandes posibilidades de aplicación biotecnológica y agroalimentaria.

El NO tiene una función esencial como molécula señal en diferentes procesos intracelulares. Muchas de estas acciones reguladoras o de señalización se hacen a través de modificaciones post-traduccionales, siendo la **nitricación** y **S-nitrosilación** (o S-nitrosación) de proteínas dos de los mecanismos más importantes propiciadas por el NO o moléculas derivadas (Corpas *et al.* 2013a; Corpas *et al.* 2013b; Corpas & Barroso 2015), como se verá mas adelante. Recientemente, la demostración de la presencia endógena de ácidos grasos nitrados (NO₂-FA) en células vegetales y su capacidad de regular la expresión de cientos de genes ha abierto nuevas vías de investigación que amplian aún más si cabe la importancia del NO como molécula señal (Mata-Pérez *et al.* 2017). El NO también regula la expresión de genes en procesos como la interacción

planta-patógeno (Delledonne *et al.* 1998; Polverari *et al.* 2003; Grun *et al.* 2006; Begara-Morales *et al.* 2014).

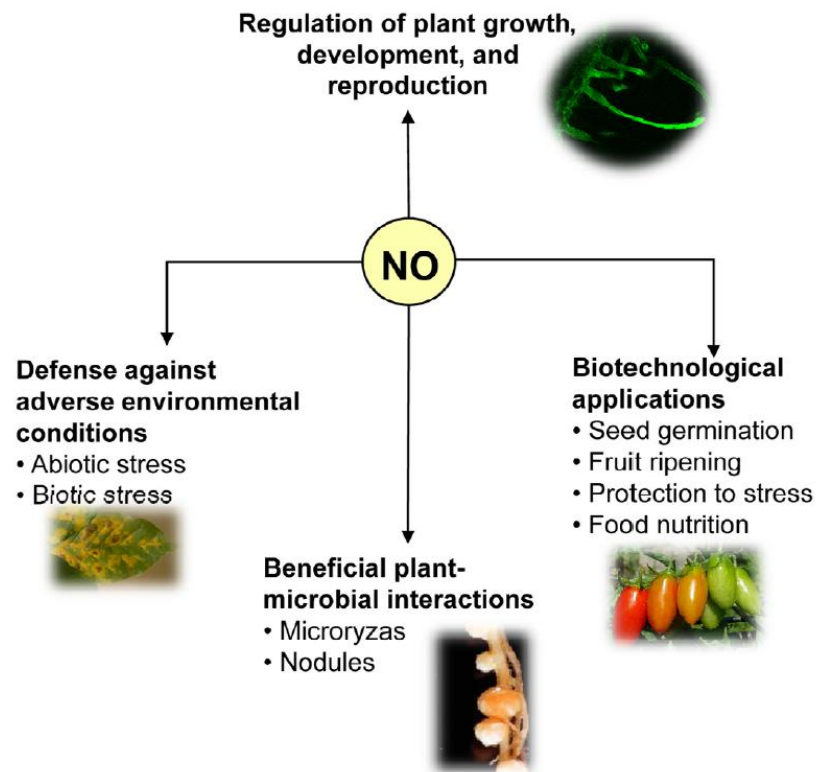


Figure 13. Main functions of NO in plants under physiological and adverse environmental conditions. Figure taken from Corpas and Barroso (2015)

Tal y como se ha ido mencionando, el NO generado endógenamente forma parte de diferentes procesos fisiológicos en plantas. Asimismo, distintas aproximaciones experimentales han comprobado cómo la aplicación exógena de NO tiene la capacidad de mejorar la tolerancia de las plantas a diferentes tipos de estreses, como la salinidad, la sequía, la contaminación por metales pesados o estrés por temperatura en diferentes especies vegetales (Tanou *et al.* 2009; Liu *et al.* 2013; Manai *et al.* 2014; Santa-Cruz *et al.* 2014; Corpas *et al.* 2016; Peng *et al.* 2016). En general, la aplicación de NO se ha realizado a través del sistema radicular usando donadores de NO como el nitroprusiato sódico (SNP). Pero también se han realizado tratamientos con NO en combinación con otros factores como la baja temperatura, demostrando la mejora de la calidad de los frutos, a través del retraso de la senescencia en los productos de post-cosecha, lo que retrasaba, en consecuencia, los daños derivados del almacenamiento de los mismos (Wills *et al.* 2000; Zhu & Zhou 2007).

Actualmente, se conoce que el NO tiene un papel esencial durante los procesos de senescencia y maduración (Leshem *et al.* 1998; Corpas *et al.* 2004; Begara-Morales *et al.* 2013), por lo que muchos de los trabajos realizados y las aplicaciones biotecnológicas han ido en esta dirección, con el propósito de retrasar la senescencia y aumentar los periodos de conservación de algunos frutos. El mecanismo de acción del NO para retrasar la senescencia parece estar relacionado con la inhibición de rutas como la de biosíntesis de etileno (Lindermayr *et al.* 2006; Zhu & Zhou 2006, 2007). Recientemente, análisis proteómicos sobre el metabolismo del NO, realizados durante la maduración de frutos de pimiento indican que este proceso está asociado a un incremento de la nitración de proteínas, muchas de ellas implicadas en el metabolismo oxidativo, como la catalasa. Además, la aplicación del NO sobre frutos de pimiento, mostró un retraso en la maduración y la prevención de la nitración de proteínas (Chaki *et al.* 2015). Estos datos se correlacionan con trabajos previos donde el NO parece estimular la respuesta de sistemas antioxidantes promoviendo así la protección frente a daños oxidativos, así como la inducción de metabolitos secundarios relacionados con el mecanismo antioxidante de las plantas (Xu 2007; Wootton-Beard & Ryan 2011).

6.3. Especies de nitrógeno reactivo (RNS) y estrés nitrosativo

El término especies de nitrógeno reactivo (*Reactive Nitrogen Species*, RNS) engloba tanto al NO como a moléculas derivadas, tales como el peroxinitrito (ONOO⁻), el dióxido de nitrógeno (NO₂), el trióxido de dinitrógeno (N₂O₃) y los nitrosotioles (SNOs), entre otras (Tabla. 5) (Hausladen & Stamler 1999; Gutteridge & Halliwell 2000; Halliwell 2007). Las RNS son altamente reactivas, pudiendo reaccionar, tal y como se ha mencionado anteriormente, con macromoléculas como proteínas, lípidos y DNA, provocando modificaciones químicas que alteran su función y/o estructura.

Table 5. Main reactive nitrogen species (RNS) including inorganic and organic molecules.
Table taken from Corpas (2017)

Nonradicals	Radicals
Inorganic molecules	
Nitroxyl anion (NO ⁻)	Nitric oxide (·NO)
Nitrosonium cation (NO ⁺)	Nitrogen dioxide (·NO ₂)
Nitrous acid (HNO ₂)	
Dinitrogen trioxide (N ₂ O ₃)	
Dinitrogen tetroxide (N ₂ O ₄)	
Peroxynitrite (ONOO ⁻)	
Peroxynitrous acid (ONOOH)	
Organic molecules	
Nitrotyrosine (Tyr-NO ₂)	Lipid peroxy radicals (LOO [·])
Nitrosoglutathione (GSNO)	
Nitrosothiols (SNOs)	
Nitro-γ-tocopherol	
Nitro-fatty acids (FA-NO ₂)	

Por otro lado, el término **estrés nitrosativo** se utiliza para describir el daño celular causado por una sobreproducción de RNS. Así se considera que una planta sufre una situación de estrés nitrosativo cuando tiene lugar una sobreproducción de NO y/o de sus especies derivadas que pueden conllevar efectos tóxicos (Corpas *et al.* 2011). Ejemplo de ello es el aumento de la nitración de proteínas frente a diferentes estreses abióticos o bióticos, que generalmente lleva a la pérdida de función (Romero-Puertas *et al.* 2007; Valderrama *et al.* 2007; Corpas *et al.* 2011).

El NO, tanto en su fase gaseosa como en su fase acuosa, puede reaccionar con el oxígeno para dar lugar a **trióxido de dinitrógeno (N₂O₃)** y **dióxido de nitrógeno (·NO₂)**. Ambos compuestos, en solución acuosa, dan lugar a cantidades estequiométricas de nitritos (NO₂⁻) y nitratos (NO₃⁻). El dióxido de nitrógeno es más soluble en membranas lipídicas que en agua, de manera que esta naturaleza lipofílica le permite atravesar las membranas celulares y reaccionar con otras moléculas (Corpas *et al.* 2011). El NO reacciona también con el radical superóxido produciendo peroxinitrito (**ONOO⁻**) (Squadrito & Pryor 1998; Corpas *et al.* 2011; Corpas 2017). El ONOO⁻ es un oxidante muy potente, cuya formación depende tanto de la concentración del NO como del radical superóxido y, por lo tanto, está directamente relacionado con las actividades SOD y NOS. Esta RNS tiene una vida media muy corta y una alta capacidad para dañar membranas biológicas. Estas propiedades le permiten reaccionar con biomoléculas como aminoácidos y proteínas de bajo peso molecular (Radi 2013a).

Por otro lado, el **ácido peroxinitroso (ONOOH)**, da lugar a la formación de radicales OH y NO₂. Esta RNS puede atravesar las bicapas lipídicas y, tras descomponerse en los radicales anteriormente mencionados, participa en el inicio de la peroxidación lipídica y de la nitración de proteínas y lípidos (Szabo *et al.* 2007).

Los **nitrosotioles (SNOs)** son metabolitos que se forman de la reacción del NO con proteínas o componentes no proteicos que contienen grupos sulfhidrilos (Foster *et al.* 2003; Corpas *et al.* 2007a) y tienen varias funciones dentro de las cuales se incluye la liberación de NO, la transnitrosación y la S-tiolación (Liu *et al.* 1998). Uno de los nitrosotioles más relevante es el S-nitrosoglutatión (GSNO) que se forma tras la reacción de S-nitrosilación entre el NO y el glutatión (GSH) en presencia de oxígeno (Astier *et al.* 2011; Broniowska *et al.* 2013; Corpas *et al.* 2013a). El GSNO tiene un importante papel en animales y plantas en los que actúa como reservorio móvil de NO. Se ha descrito que los SNOs y el GSNO en particular se pueden descomponer en presencia de reductores tales como GSH y ascorbato, y de cobre (Gorren *et al.* 1996; Holmes & Williams 2000; Smith & Dasgupta 2000) El GSNO también puede mediar en rutas de señalización celular mediante modificaciones post-traduccionales de proteínas (Barroso *et al.* 2013). El papel de este SNOs también radica en la importancia del GSH, ya que es uno de los mayores antioxidantes solubles de bajo peso molecular en plantas (Foster *et al.* 2003; Airaki *et al.* 2011; Corpas *et al.* 2013a). Los niveles de este metabolito están determinados por la actividad enzimática S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR) que cataliza su reducción, en una reacción dependiente de NADH. Se ha descrito que esta enzima es imprescindible en levaduras, plantas y mamíferos para proteger a las células frente al estrés nitrosativo (Valderrama *et al.* 2007; Leterrier *et al.* 2011; Kubienová *et al.* 2013).

6.4. Modificaciones post-traduccionales (PTMs)

Muchas de las acciones reguladoras o de señalización del NO se hacen a través de modificaciones post-traduccionales, siendo la **nitración** y **S-nitrosilación** de proteínas dos de los mecanismos más importantes mediadas por RNS como el peroxinitrito (ONOO⁻) y los S-nitrosotioles (SNOs) (Fig.15) (Astier *et al.* 2012; Astier & Lindermayr 2012; Corpas *et al.* 2013b; Corpas & Barroso 2015).

La **nitración de proteínas** es una modificación por la cual se añade un grupo nitro (-NO₂) a algunos aminoácidos tales como tirosina (Tyr), cisteína (Cys), metionina

(Met) o triptófano (Trp) (Radi 2004, 2013a; Corpas *et al.* 2015b). Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados en plantas han estado relacionados con la nitración de la tirosina (Tyr-NO₂) (Gow *et al.* 2004). Es un proceso selectivo que tan solo afecta a ciertas tirosinas dentro de las proteínas y que depende de determinados factores como la estructura de la proteína, el mecanismo de nitración y la localización de las tirosinas susceptibles en la cadena aminoacídica. La nitración de las tirosinas es un proceso irreversible que puede alterar la función de la proteína, bien inhibiendo su actividad o activándola, o no generando ningún efecto (Souza *et al.* 2008; Radi 2013b). Durante estos últimos años se ha aceptado la existencia de un nivel fisiológico de proteínas nitradas el cual debe tener una relevancia reguladora, aunque bajo condiciones de estrés su aumento podría ser considerado como un marcador fiable de estrés nitrosativo (Corpas *et al.* 2007b; Astier & Lindermayr 2012).

La **S-nitrosilación** es una PTM que regula la función de proteínas mediante la unión covalente del NO con el grupo tiol de un residuo de cisteína de las proteínas. Esta modificación también es un proceso que suele darse en residuos de cisteína específicos, y se tratará más ampliamente en la introducción del capítulo 4. Por otro lado se ha descrito que éste es un proceso reversible por lo que en las células se producen casos de desnitrosilación. Dentro de las enzimas que llevan a cabo la desnitrosilación se encuentran la GSNOR y las tiorredoxinas, y son especialmente importantes debido a que regulan diferentes procesos de señalización celular protegiendo, a la célula por tanto, frente al estrés nitrosativo (Benhar *et al.* 2009). En la figura 14 se muestra un modelo de MPTs propiciadas por NO y otras RNS (Corpas *et al.* 2015b).

Aunque la nitración es una de las modificaciones post-traduccionales más estudiadas en plantas, la **nitración de ácidos grasos** es una de las áreas de gran expansión la cual está abriendo nuevas líneas de investigación. La relevancia de ácidos grasos nitrados (NO₂-FA), como potencial molécula señal en plantas superiores está basada principalmente en la información disponible en sistemas animales, donde se ha demostrado que estas moléculas poseen propiedades antiinflamatorias y pueden modular diferentes rutas de señalización (Baker *et al.* 2009; Mata-Pérez *et al.* 2017).

La formación de NO₂-FA resulta de la interacción no enzimática entre ácidos grasos y RNS como el dióxido de nitrógeno (NO₂), nitrito (NO₂⁻), o peroxinitrito

(ONOO⁻); sin embargo, el mecanismo íntimo de nitración de ácidos grasos sigue siendo motivo de análisis (Rubbo 2013; Corpas *et al.* 2015b).

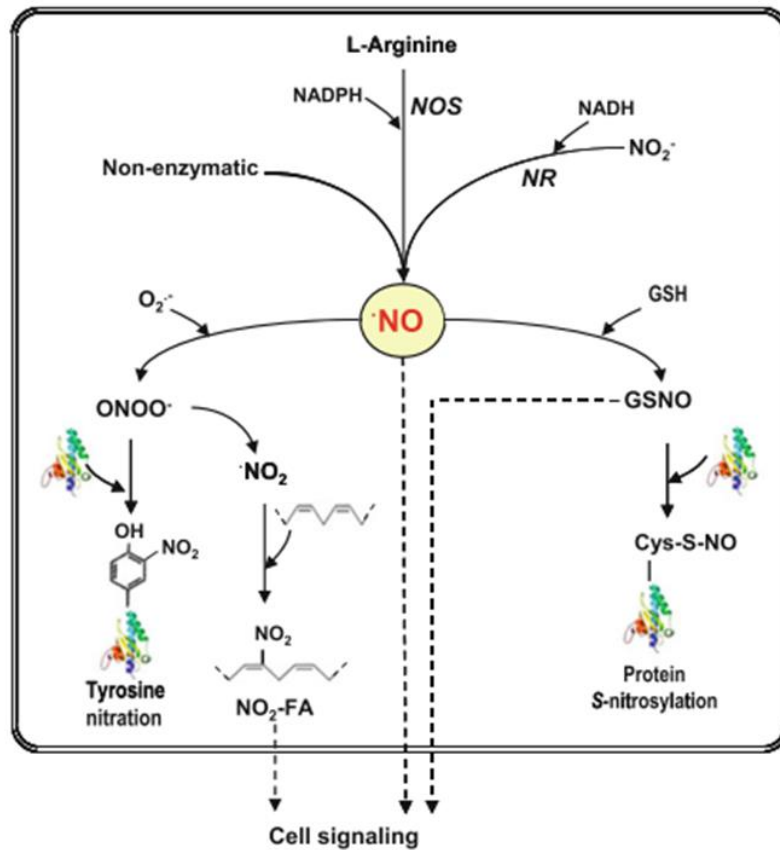


Figure 14. Model of post-traslational modifications mediated by nitric oxide in plant cells. NO can reacts with reduced glutathione (GSH) leading to the formation of S-nitrosoglutathione (GSNO) that produces protein S-nitrosylation. Furthermore, NO is able to react with superoxide radicals (O₂⁻) to generate peroxynitrite (ONOO⁻), which can mediate the fatty acid (FA) and protein tyrosine nitration. Taken from Corpas *et al.* (2015b).

OBJETIVOS
OBJECTIVES

La maduración de los frutos de pimiento (*Capsicum annuum* L.) es un proceso complejo en el cual tienen lugar diferentes cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares. Estos pueden estar modulados por diversos mecanismos de señalización molecular que finalmente condicionarán la calidad del fruto. Moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el óxido nítrico (NO), al igual que moléculas relacionadas conocidas como especies de oxígeno y nitrógeno reactivas (ROS/RNS, respectivamente), pueden participar bien directa o indirectamente, a través de modificaciones post-traduccionales (PTMs), en estos procesos de señalización. Asimismo, los antioxidantes celulares, tanto enzimáticos como no enzimáticos, regulan los niveles de ROS y, por lo tanto, pueden estar modulando la maduración de los frutos. En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada) se ha analizado el perfil de antioxidantes durante la maduración de los frutos de pimiento, así como algunas modificaciones post-traduccionales (nitración) que sufren ciertas proteínas como la enzima antioxidante catalasa. Así, el objetivo general de esta tesis doctoral es profundizar en cómo los sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos, y su interacción con RNS pueden regular el proceso de maduración del fruto de pimiento, de manera que esta investigación pueda ser de utilidad para desarrollar estrategias que ayuden a mantener las propiedades nutricionales de los frutos durante la maduración y en las etapas post-cosecha.

Los objetivos concretos que se han planteado en esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Caracterizar bioquímica y molecularmente los sistemas enzimáticos antioxidantes implicados en la eliminación de H_2O_2 en frutos de pimiento en distintos estados de maduración, fundamentalmente, catalasa y peroxidasas.
2. Estudiar la modulación de las distintas isoenzimas de superóxido dismutasas (SODs) en frutos de pimiento, con especial atención a la ferro-superóxido dismutasa (Fe-SOD).
3. Investigar y caracterizar las enzimas implicadas en las rutas de biosíntesis, regeneración y catabolismo del ácido ascórbico, L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH) y ascorbato peroxidasa (APX). Estudiar la modulación de las mismas por diferentes RNS.

Objetivos-Objectives

4. Estudiar la enzima nitrosoglutation reductasa (GSNOR) durante la maduración de frutos de pimiento, así como su correlación con el contenido de S-nitrosotioles (SNOs) proteicos durante este proceso.

Fruit ripening in pepper (*Capsicum annuum* L.) fruits is a complex process in which different physiological, biochemical and molecular changes take place. These can be modulated by diverse mechanisms of molecular signaling that may influence the fruit quality. Molecules such as hydrogen peroxide (H₂O₂) and nitric oxide (NO), similarly to related molecules known as reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS, respectively), can participate either directly or indirectly, through post-translational modifications (PTMs), in these signaling events. Likewise, the cell antioxidants, both enzymatic and non-enzymatic, regulate the ROS levels and, therefore, are able to modulate the fruit ripening. In previous studies carried out by our research team at the Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada), the profile of antioxidants during ripening of pepper fruits was achieved, as well as some PTMs (nitration basically) which undergo certain proteins such as the antioxidative enzyme catalase. Thus, the main goal of this PhD Thesis is to deepen in how the antioxidant systems, both enzymatic and non-enzymatic, and their interaction with RNS can regulate the ripening process in pepper fruits, in such a way that this research could be used to develop strategies whose purpose was to maintain the nutritional properties of fruits throughout the ripening and post-harvest stages.

The specific objectives which have been designed for this PhD Thesis are as follows:

1. To characterize biochemically and molecularly the enzymatic antioxidant systems involved in the H₂O₂ scavenging in pepper fruits at different ripening stages, basically, catalase and peroxidases.
2. To study the modulation of distinct isozymes of the superoxide dismutase (SOD) system in pepper fruits, with special emphasis on the Fe-SOD.
3. To investigate and characterize the enzymes involved in the pathways of biosynthesis, regeneration and catabolism of ascorbic acid, L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) and ascorbate peroxidase (APX). To study the modulation of such enzymes by several RNS.
4. To analyze the enzyme nitrosogluthione reductase (GSNOR) during pepper ripening and its correlation with the content of protein S-nitrosothiols (SNOs) during this process.

MATERIAL Y MÉTODOS
MATERIALS AND METHODS

1. Material vegetal

Para el desarrollo de este trabajo se han empleado pimientos dulces del tipo California y variedades autóctonas españolas en diferentes estados de maduración, verde y rojo. Los pimientos tipo California, así como las semillas del híbrido experimental BW 45913/631, fueron proporcionados por la empresa Syngenta Seeds, S.A. (El Ejido, Almería) y Torre-Pacheco (Murcia). También se emplearon pimientos proporcionados por los Consejos Reguladores de la Denominación de origen (CRDO) Pimiento de Herbón (A Coruña) y Pimiento de Piquillo-Lodosa (Navarra) (Fig.15).

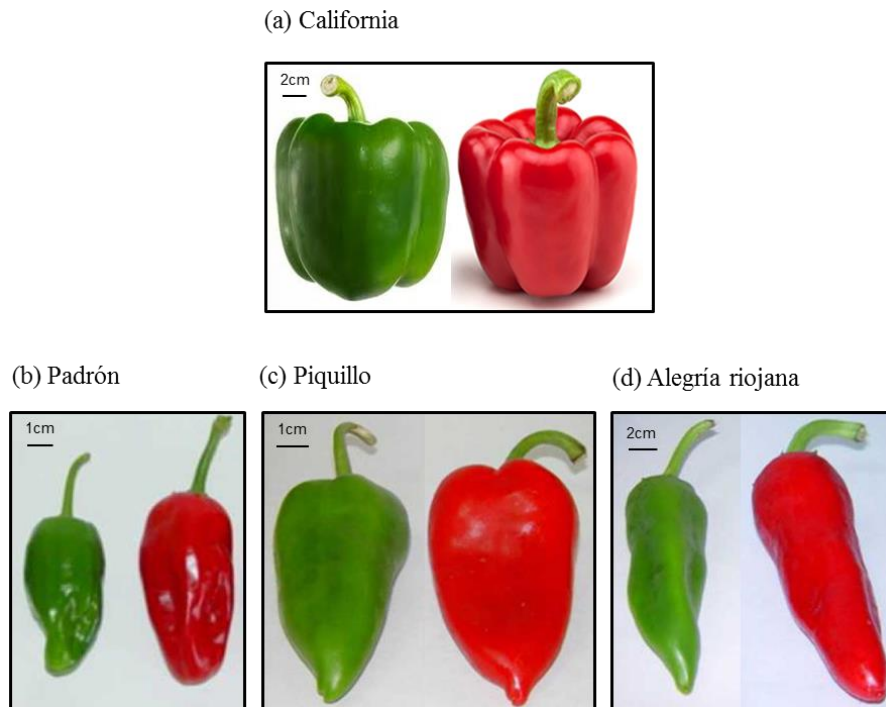


Figure 15. Types of pepper fruits used in this work. (a) California pepper fruits in two maturation stages. **(b)** Padrón variety (CRDO Herbón) **(c)** Piquillo variety **(d)** Hot pepper fruits, Alegria riojana variety.

Todos los frutos fueron sometidos a un proceso de selección en el que se elegían aquellos que no presentaban daños visibles ni malformaciones. Para su almacenamiento y posteriores análisis, los pimientos fueron lavados y secados. Seguidamente, los pimientos fueron cortados por la mitad, se les eliminó las semillas y la placenta y se procesó solo el endocarpio. Tras esta operación, se cortaron en pequeños trozos homogéneos (Fig. 16) que fueron congelados con nitrógeno líquido, guardados en tubos Falcon y conservados a -80°C hasta su uso.



Figure 16. Processing of pepper fruits for further assays. All fruits were cut into small pieces and then frozen in liquid N₂. All of them were stored at -80°C.

Las semillas de pimiento fueron desinfectadas por inmersión en hipoclorito sódico al 50% (v/v) durante 5 min; seguidamente se realizaron 3 lavados con agua destilada. Las semillas se dispusieron sobre tiestos de 1 litro con vermiculita hidratada en una estufa a 30°C en oscuridad hasta que comenzaron a germinar. Posteriormente se trasplantaron a cultivos hidropónicos y se pasaron a una cámara de crecimiento con una temperatura de 22°C/18°C (día/noche), y un fotoperiodo de 16 h. Las plantas se mantuvieron en estas condiciones hasta la formación de frutos en su estado pre-maduro (verdes; aprox. 90 días). Cada órgano de la planta (raíz, tallo, hoja, flor y fruto) fue separado y lavado con agua destilada y almacenado a -80°C para ensayos posteriores (Fig.18).

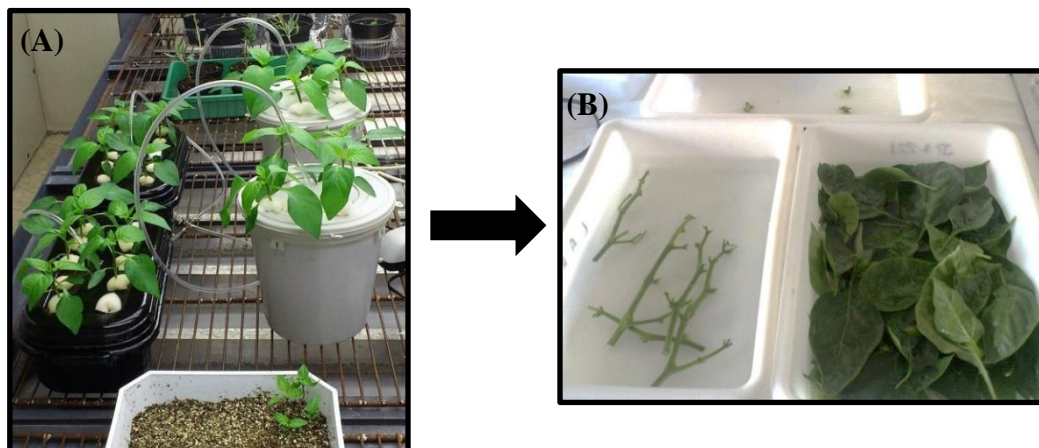


Figure 17. Growing conditions and storage of pepper plant's organs. Pepper seeds were placed into pots containing vermiculite for germination. (A) Subsequently, plantlets were transplanted to hydroponic media and grown in a growth chamber at 22/18 °C and 16 h photoperiod. (B) Afterwards, plant's organs were separated, cleaned and stored at -80°C.

La solución nutritiva para los cultivos hidropónicos se fijó a un pH de 6,5 con las concentraciones que se especifican en la tabla 6. A lo largo del ensayo la solución se renovó semanalmente.

Table 6. Hydroponic nutrient solution

MACRONUTRIENTS	mM	MICRONUTRIENTS	μM
KH_2PO_4	1.15	H_3BO_3	46.2
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.10	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	9.10
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.55	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.79
KNO_3	3.60	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.06
K_2SO_4	1.15	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.05
KOH	0.09	EDDHA · Fe	90
H_2SO_4	0.60		

EDDHA.Fe: iron chelating chemical ethylenediamine-N,N'-bis (2-hydroxyphenylacetic acid).

2. Tratamiento de plantas de pimiento con distintas condiciones experimentales

2.1 Alta intensidad lumínica

Se irradiaron las plántulas de pimiento de 37 días durante 4, 6 y 8 horas a $1.180 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, siendo la distancia media desde el pie de maceta a la fuente luminosa de 37,5 cm, y usándose una lámpara GE 300W-230 V tipo PAR 56/WFL. Para evitar el aumento de temperatura, se interpuso entre la fuente luminosa y la planta una placa Petri (19 cm de diámetro y a unos 4 cm sobre las plantas) rellena de agua, la cual se cambió cada 20-30 minutos (Fig. 18).

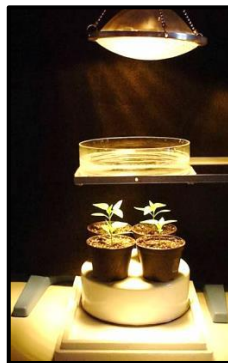


Figure 18. Pepper plants exposed to high light intensity

2.2 Daño mecánico

Se practicaron 5 incisiones sobre las hojas de las plántulas de pimiento mediante pinzamiento, y se mantuvieron durante 4-6 horas en cámara de cultivo; posteriormente se procesaron las hojas.

3. Tratamiento de frutos de pimiento en una atmósfera enriquecida con óxido nítrico (NO)

Para el tratamiento con NO se seleccionaron pimientos en estado envero y se siguió el método descrito por Chaki *et al.* (2015). Los pimientos se colocaron en cajas de metacrilato de 25 L y se les hizo vacío durante 35 min. Finalizado el periodo de vacío, los pimientos se sometieron al tratamiento con óxido nítrico. Para la generación de NO se pesaron 0,1 g de hilo de cobre que se añadieron a 30 ml de ácido nítrico (HNO₃) al 20 % (v/v) (Fig. 19).

A concentraciones saturantes de HNO₃, se produce dióxido de nitrógeno según la siguiente reacción:



Tras ser consumido parcialmente el ácido nítrico, tiene lugar la segunda reacción, en la que ya se produce óxido nítrico, según la siguiente reacción



El NO₂ de la primera reacción es atrapado por hidróxido de sodio al 18 % (p/v) en un matraz anejo, dejando que el NO fluya libre hasta la cámara de incubación en la que se dispusieron los frutos de pimiento. El NO generado fue bombeado a la caja de metacrilato mediante un mecanismo de succión integrado en un equipo de detección de NO (Nitric Oxide Meter, Environmental Sensor Co; Boca Raton, FL, USA). Dicho bombeo se realizó hasta que se alcanzaron 5 ppm (160 μmol L⁻¹) de NO en la cámara. En ese momento, las cajas fueron cuidadosamente selladas y la incubación se mantuvo durante 1 h a temperatura ambiente. Tras el periodo de incubación, las cajas se abrieron y los pimientos se mantuvieron durante 1-2 semanas en dos condiciones diferentes, a 6

°C y a temperatura ambiente (RT), con el fin de evaluar el efecto sobre la maduración en los frutos de pimiento.

Como condiciones control, se seleccionaron pimientos envero que fueron sometidos a las mismas condiciones de incubación pero sin tratamiento con NO. Los pimientos se metieron en una caja de metacrilato a la cual se la aplicaron 35 min de vacío y posteriormente fue sellada y mantenida durante 1 h a temperatura ambiente sin añadir ningún gas. Finalizado el tiempo de incubación, se almacenaron unos pimientos a 6 °C durante 1-2 semanas, y otros a temperatura ambiente durante el mismo periodo de tiempo.

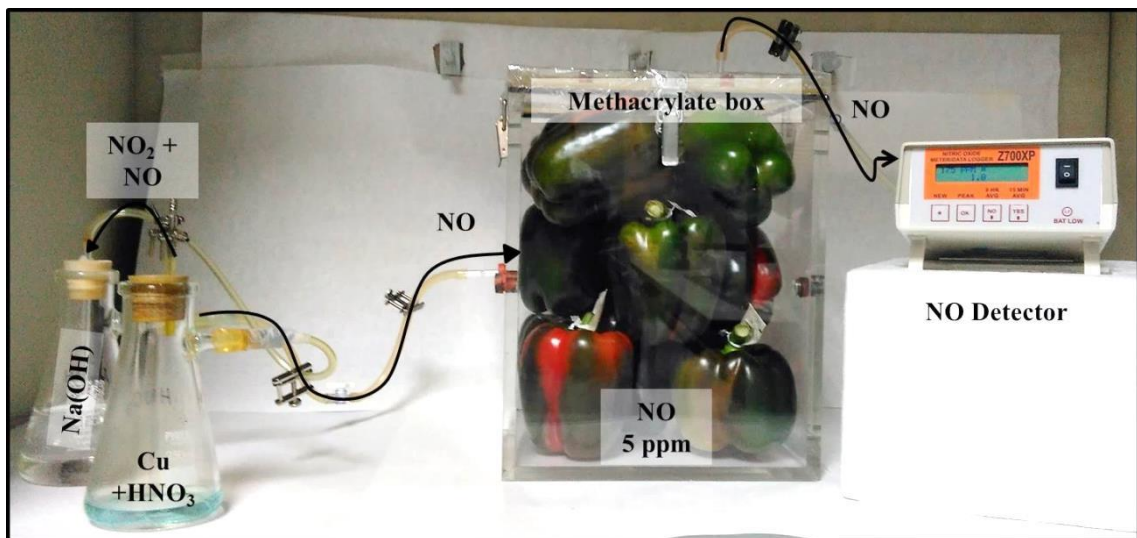


Figure 19. Incubation of pepper fruits with nitric oxide gas. NO was generated through the reaction of solid copper with nitric acid. NO was pumped into the chamber until a concentration of 5 ppm was reached as indicated in the NO detector. Then, all connections were tightly sealed and maintained for 1 hour. Previous to the incubation chamber, a flask with 18% (w/v) NaOH was placed to trap the NO₂ generated by the reaction of excess Cu and HNO₃.

4. Preparación de extractos crudos para ensayos bioquímicos

4.1. Homogenados de frutos

Para la realización de los extractos de fruto de pimiento se trabajó con el material almacenado a -80°C anteriormente descrito. Los trozos de pimiento congelados fueron triturados en un molinillo IKA A 11 Basic con nitrógeno líquido, obteniendo así un polvo homogéneo.

Una vez triturado el material, se procedió a la elaboración de los extractos, para la cual se empleó una relación 1:1 (p/v) con un tampón de extracción que contenía Tris-

Material y Métodos/ Materials and Methods

HCl 100 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM, Triton X-100 0,1% (v/v) y glicerol 10% (v/v). Una vez realizada la homogenización los extractos fueron centrifugados a 27.000 g durante 25 min a 4°C en una centrifuga refrigerada Hettich. Los sobrenadantes fueron empleados en los diferentes ensayos. Para la preparación de extractos destinados a la medida de la actividad ascorbato peroxidasa (APX), se incluyó ascorbato 2 mM en el tampón de extracción.

Para los ensayos de las actividades enzimáticas, los extractos fueron pasados por columnas de exclusión molecular Sephadex G25 desechables, NAPTM-10 ó NAPTM-5 (GE Healthcare), con el fin de eliminar las pequeñas moléculas que pudiesen interferir en las medidas.

4.2. Homogenados de hojas, raíces, flores y tallos

Para la realización de los extractos se trituró cada material por separado usando mortero y pistilo en presencia de nitrógeno líquido. El material se extrajo en un tampón de homogeneización Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM, Triton X-100 0,1% (v/v), glicerol 10% (v/v), DTT 2 mM y PVPP 1% (p/v), con una proporción 1:2 (p/v). Tras la homogenización, los extractos se centrifugaron a 27.000 g durante 25 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada Hettich. Con los sobrenadantes obtenidos se realizaron los correspondientes ensayos.

4.3. Fracciones subcelulares enriquecidas en mitocondrias

Para la determinación de la actividad enzimática L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa se prepararon extractos enriquecidos en mitocondrias; para ello se llevó a cabo una modificación del método descrito por Jiménez *et al.* (2002). Los frutos se lavaron y cortaron manualmente, e inmediatamente fueron incubados en un medio de homogenización en una relación 1:1 (p/v) durante 30 min a 4°C. Todas las operaciones fueron llevadas a cabo a 4°C, con el fin de preservar la integridad de los orgánulos. El tampón de homogenización contenía Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, KCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA 1 mM y sacarosa 400 mM.

Tras el periodo de incubación en el medio, se procedió a la trituración y homogenización de dicho material en una batidora Ufesa Multi Blender con pulsos suaves. El homogenado se filtró a través de dos capas de entretela y se centrifugó a 4.600 g durante 20 min. Tras la centrifugación el sobrenadante fue centrifugado a

16.000 g durante 15 min. Finalizada la centrifugación el precipitado obtenido se resuspendió suavemente con un pincel de cerdas naturales en el mismo medio de extracción mencionado anteriormente. Finalizada la resuspension el material, el material enriquecido en mitocondrias, fue utilizado en los diferentes ensayos.

5. Aislamiento y purificación de peroxisomas de fruto de pimiento

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C, con el objeto de preservar en todo momento la integridad de los orgánulos. El método utilizado para el aislamiento de los orgánulos fue el descrito anteriormente para frutos de pimiento (Mateos *et al.* 2003). El método consiste en varias centrifugaciones diferenciales seguidas de una centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa. Los frutos se lavaron con agua desionizada y se trocearon manualmente en piezas de 5-10 cm² de sección, e inmediatamente después se incubaron durante 30 min a 4°C con el tampón de homogeneización en una relación 1:1 (p/v). Transcurrido ese tiempo, los frutos se homogeneizaron en una batidora Ufesa Multi Blender en pulsos suaves separados por unos segundos. La composición del tampón de homogeneización fue de Tricina-KOH 255 mM, pH 7,5, KCl 15 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 1,5 mM, sacarosa 1,5 M, BSA 0,3% (p/v) para pimiento verde y 0,4% (p/v) BSA para pimiento rojo, y DTT 7,5 mM. El homogenado se filtró a través de dos capas de entretela y se centrifugó a 4.600 g durante 20 min para eliminar la mayor parte de plastidios, núcleos y residuos celulares. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 12.000 g durante 15 min y el precipitado obtenido se resuspendió con un pincel suave en un medio de extracción que contenía Tricina-KOH 170 mM, pH 7,0, KCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 1 M, y BSA 0,3 % (p/v). La suspensión de orgánulos se depositó con ayuda de una jeringa, en la parte superior de un gradiente discontinuo de sacarosa compuesto por 3 mL del 60%, 6 mL del 57%, 9 mL del 51%, 9 mL del 47%, 6 mL del 42% y 3 ml del 35% de sacarosa (p/v). Las soluciones de sacarosa se prepararon a partir de una solución madre de sacarosa al 66% (p/v) preparada en Na₂-EDTA, 1 mM, pH 7,5. Los gradientes de sacarosa se prepararon en tubos Quick Seal (Beckman) y se centrifugaron a 80.000 g durante 1 h y 30 min en una ultracentrífuga Beckman con un rotor vertical VTi50. Finalizada la centrifugación, los peroxisomas se situaban en la parte inferior del gradiente en la interfase entre las capas de 57% y 51% (p/v) de sacarosa (López-Huertas *et al.* 1995), en una densidad media de 1,24 g·cm⁻³. La banda correspondiente a la fracción de los peroxisomas se extrajo de los

gradientes mediante la perforación de los tubos de centrifuga con una aguja hipodérmica conectada a una jeringa de vidrio. Las matrices peroxisomales (fracción soluble) se separaron de las membranas mediante choque osmótico por dilución 1:3 (v/v) con tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8 Na₂-EDTA 1 mM con agitación suave a 4°C durante 1 h y posterior centrifugación a 120.000 g durante 35 min en un rotor Beckman 70Ti. El sobrenadante que contiene las proteínas solubles del orgánulo se concentró por ultrafiltración con nitrógeno utilizando una membrana PM-10 de Amicon, sobre la que se ejerció una presión de 60 psi. Con las matrices concentradas se realizaron los ensayos correspondientes o bien se congelaron a -20°C hasta su uso.

6. Determinación de actividades enzimáticas

6.1. L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH; EC 1.3.2.3)

Esta actividad se midió siguiendo el método descrito por Ôba *et al.* (1994) con algunas modificaciones. Este método se basa en medir la reducción del citocromo *c* dependiente de L-galactono-1,4-lactona (L-GalL) a 550 nm, 22°C y durante 2 min por la acción de la enzima. La mezcla de reacción contenía tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,4, KCN 0,1 mM, citocromo *c* 85 µM, L-galactono-1,4-lactona 4,2 mM, y muestra, en un volumen final de 1,05 mL. Para la medida se comenzó con una incubación, en la cubeta de medida, de la muestra con el KCN durante 1 min; finalizada la incubación se añadieron el resto de reactivos, disparándose la reacción con la L-GalL. Se utilizó un control sin muestra y asimismo se realizaron blancos para cada muestra sin L-GalL. Para la completa oxidación del citocromo *c*, la solución fue borboteada durante unos minutos con una bomba de tipo pecera. La actividad enzimática, expresada en nmoles de citocromo *c* reducido·min⁻¹·mg⁻¹ proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción en la cubeta problema menos la del blanco sin L-GalL, utilizando un coeficiente de extinción molar para el citocromo *c* de 21,3 mM⁻¹·cm⁻¹.

6.2. Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)

- **Ensayo espectrofotométrico**

Para la determinación de la actividad catalasa se siguió el método descrito por Aebi (1984), en el cual se mide la disminución de la absorbancia a 240 nm debida a la descomposición del H₂O₂ por efecto de la enzima. Las medidas se realizaron en una

cubeta de cuarzo a la cual se añade la muestra, y una mezcla de reacción formada por tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,0 y H₂O₂ 10,6 mM hasta completar un volumen final de 1 mL. La reacción fue medida durante 2 min a 25°C en un espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201, frente a un blanco compuesto por agua destilada. La actividad enzimática expresada en $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de la reacción y de un coeficiente de extinción molar para el H₂O₂ de $39,58 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

- **Actividad isoenzimática en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes**

Para el análisis de la actividad catalasa en geles de poliacrilamida se siguió el método descrito por Clare *et al.* (1984). Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA) al 5 y 6 % de acrilamida en condiciones nativas (apartado 8.2). Tras la electroforesis, los geles se incubaron en una solución que contenía peroxidasa de rábano 50 $\mu\text{g/mL}$ (SIGMA) en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,0, durante 45 min. A esta solución se le añadió H₂O₂ a una concentración de 5 mM y se mantuvo la incubación 10 min más en oscuridad. Posteriormente, los geles fueron incubados en una solución de 3,3-diaminobencidina (DAB) 0,5 mg/mL en el tampón fosfato-K hasta la aparición de bandas incoloras sobre un fondo marrón.

6.3. Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)

- **Ensayo espectrofotométrico**

Para la medida espectrofotométrica de esta actividad los extractos fueron preparados añadiendo al tampón de extracción ascorbato 2 mM con el fin de evitar la inactivación de la enzima. El método seguido se basa en la medición de la oxidación de ácido ascórbico a 290 nm durante 1 min a 25 °C (Hossain and Asada, 1984). La mezcla de reacción contenía Hepes-NaOH 50 mM, pH 7,6, ascorbato 0,2 mM y H₂O₂ 0,3 mM, todo ello en un volumen final de 1 mL. La reacción se inició por la adición del H₂O₂. Se realizaron tres controles, uno sin ascorbato, otro sin H₂O₂ y el último sin muestra. Para el cálculo de la actividad se utilizó el coeficiente de extinción molar del ácido ascórbico a 290 nm de $2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y la actividad se expresó en nmoles de ácido ascórbico oxidado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

- **Actividad isoenzimática en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes**

El método seguido para el revelado de los geles fue una modificación del descrito por Bieker *et al.* (2012). Para la separación de las distintas isoenzimas se realizó una EGPA en condiciones nativas (apartado 8.2) en geles al 10% de acrilamida, si bien el tampón de electrodos se preparó con ascorbato 2 mM. Una vez preparados los geles, estos fueron sometidos a un pre-recorrido electroforético de 30 min a 120 V antes de cargar las muestras. Finalizada la electroforesis los geles fueron incubados en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,0, y ascorbato 2 mM durante 30 min; seguidamente se incubaron de nuevo los geles durante 10 min en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,0, ascorbato 4 mM y H₂O₂ 0,5 μM. Finalizada esta incubación los geles se equilibraron en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8 durante 1-2 min para finalmente ser revelados en presencia de una solución de NBT 2,45 mM y TEMED 14 mM. Los geles se mantuvieron en esta solución hasta la visualización de las primeras bandas acromáticas sobre un fondo violeta.

6.4. Monodeshidroascorbato reductasa (MDAR; EC 1.6.5.4)

El método utilizado para la medida de la MDAR, se basa en la medida de la oxidación del NADH a 340 nm. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1 mL que contenía tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, ascorbato 40 mM, ascorbato oxidasa 0,5 U, NADH 8 mM y 25 μL de muestra. Se utilizó un blanco de reacción compuesto por tampón, muestra y NADH, así como un control sin muestra. Se realizó una comprobación del sistema de generación de monodeshidroascorbato (MDA) midiendo previamente la mezcla de ascorbato 1 mM y ascorbato oxidasa 0,5 U; este ensayo debe dar una $DO \cdot \text{min}^{-1} = 0,01-0,02$. La medida se llevó a cabo durante 1 min a 25°C. Para el cálculo de la actividad se utilizó el coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y la actividad se expresó en nmoles de NADH $\cdot \text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

6.5. Deshidroascorbato reductasa (DAR; EC 1.8.5.1)

Para la medida de la actividad enzimática de la DAR se siguió el método basado en la formación de ascorbato a 265 nm. La mezcla de reacción, realizada en cubetas de cuarzo, estaba compuesta por tampón-K 50 mM, pH 6,5, EDTA 0,1 mM, GSH 2,5 mM, DHA 0,2 mM y 20 μl de muestra; todo ello en un volumen final de 1 mL. Se

realizaron 3 blancos: un blanco del tampón, un blanco de reactivos sin muestra y un blanco de muestra en ausencia de DHA.

La medida se realizó durante 5 min a 265 nm y 25°C. Para el cálculo de la actividad se utilizó el coeficiente de extinción molar del ascorbato de $14 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$, expresando la actividad como nmoles de ascorbato $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ prot.

6.6. Glutación reductasa (GR; EC 1.6.4.2)

Para la determinación espectrofotométrica de esta actividad se siguió el método descrito por Edwards *et al.* (1990), basado en la medida de la tasa de oxidación del NADPH a 340 nm durante 3 min a 25°C. En la reacción se produce la transformación del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) en un volumen final de 1 mL que contenía tampón Hepes-NaOH 0,1 M, pH 7,8, EDTA 1 mM, MgCl_2 3 mM, GSSG 0,5 mM, y NADPH 0,2 mM. Se utilizaron 3 controles, uno sin muestra y sin GSSG, otro sin GSSG, y un tercero sin muestra. La actividad enzimática, expresada en nmoles de NADPH oxidado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Jiménez *et al.* 1997).

6.7. Nitrosoglutación reductasa (GSNOR; EC 1.2.1.1)

- **Ensayo espectrofotométrico**

La medida de esta actividad se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Barroso *et al.* (2006). Se midió la oxidación del NADH a 340 nm y 25°C en una mezcla de reacción que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 0,5 mM, NADH 0,2 mM y S-nitrosoglutation (GSNO) 0,4 mM, con el cual se iniciaba la reacción. La solución de GSNO se preparó de forma extemporánea manteniéndose en frío y protegida de la luz. La actividad, considerando el coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, se expresó en nmol de NADH $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ prot.

- **Actividad en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes**

La técnica llevada a cabo para el análisis de la actividad GSNOR en geles, se basa en el método descrito por Barroso *et al.* (2006). Se realizaron electroforesis en condiciones nativas con geles al 6% de acrilamida. Para analizar la actividad, tras la electroforesis los geles fueron incubados durante 15 min a 4°C en una solución que contenía NADH 2

mM, preparada en tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4. Tras esta incubación los geles fueron cubiertos con papel de filtro humedecido con una solución de GSNO 5 mM preparada en fresco. Transcurrido unos 10 min de incubación, el papel fue retirado y los geles fueron expuestos a luz ultravioleta hasta la aparición de bandas oscuras, que corresponden con la oxidación del NADH por acción de la enzima, sobre un fondo claro (Sakamoto *et al.* 2002; Barroso *et al.* 2006).

6.8. Peroxidasas

• Ensayo espectrofotométrico

Se modificó el método descrito por Quessada and Macheix (1984), basado en la detección a 470 nm de guayacol oxidado, producido por la acción de peroxidasas. La medición se realizó a 25°C durante 15 min. La mezcla de reacción, en un volumen final de 1,2 mL, contenía tampón fosfato 50 mM pH 6,1, guayacol 6,25 mM, H₂O₂ 1,25 mM y la muestra convenientemente diluida. La reacción se inició con la adición H₂O₂ y la actividad se expresó en nmoles de guayacol·min⁻¹·mg⁻¹ de proteína, calculada aplicando un coeficiente de extinción molar (ϵ_{470}) para el guayacol oxidado de 26,6 mM⁻¹cm⁻¹.

• Actividad isoenzimática en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes

Para la detección de la actividad peroxidasa en geles se siguió el método descrito por Ádám *et al.* (1995). Se realizó una EGPA en condiciones nativa (apartado 8.2) empleándose geles al 8% de acrilamida. Finalizada la electroforesis los geles fueron incubados en un tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5 que contenía 3,3-diaminobencidina (DAB) 1 mM y H₂O₂ 0,03% (v/v) durante 20 min. Pasado este tiempo aparecían en el gel bandas de color marrón frente a un fondo transparente.

6.9. Citocromo *c* oxidasa (CCO; EC 1.9.3.1)

Para la determinación espectrofotométrica de la actividad citocromo *c* oxidasa se siguió el método descrito por Schnarrenberger *et al.* (1971). Las medidas se realizaron a 550 nm, 25°C durante 2 min. Todas las lecturas se hicieron frente a un blanco con citocromo *c* oxidado que contenía tampón fosfato-K 0,1 M pH 7,0, Triton X-100 0,1% (v/v), citocromo *c* reducido 20 µM, y una solución de [Fe(CN)₆]K₃ saturada. Las medidas se realizaron en un volumen final de 1 mL compuesto por la muestra, Tritón X-100 0,1%

(v/v) y citocromo *c* reducido 20 μM . Para realizar la medida se incubó la muestra con el triton durante 3 min; finalizado este periodo de incubación se añadió el citocromo *c* y se realizó la lectura. El citocromo *c* reducido se preparó añadiendo a una solución de citocromo *c* 20 μM en tampón de reacción, ditionito sódico hasta una concentración final de 0,4 mM. Esta mezcla se aireó durante 10 min, y el grado de reducción del citocromo *c* se controló midiendo el cociente $\text{DO}_{550}/\text{DO}_{565}$, que debe estar comprendido entre 8-11. La actividad se expresó en nmoles de citocromo *c* oxidado $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, utilizando un coeficiente de extinción molar para el citocromo *c* de $21,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.10. Superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1)

- **Análisis isoenzimático en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes**

El método de relevado usado para el análisis isoenzimático de SODs es el descrito por Beauchamp and Fridovich (1971). Para la separación de las diferentes isoenzimas se realizó una EGPA en condiciones nativas (apartado 8.2). Finalizada la electroforesis los geles se incubaron en una solución de NBT 2,45 mM preparado en tampón fosfato-K 50 mM pH 7,8 durante 20 min en oscuridad. Finalizada esta primera incubación, los geles se transfirieron a una solución de riboflavina 28 μM y TEMED 28 mM en el mismo tampón durante 15 min en oscuridad. Finalmente los geles se expusieron a la luz en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8 durante 10 min hasta la aparición de bandas acromáticas sobre el fondo azul del gel.

Para la identificación de las diferentes isoenzimas de SOD, una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron pre-incubados durante 30 min bien en presencia de KCN 2 mM o de H_2O_2 5 mM preparados en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8, y posteriormente se continuaba con el ensayo de la actividad. Las isoenzimas de la CuZn-SOD son inhibidas por el CN^- y por el H_2O_2 ; las Fe-SODs son inhibidas por el H_2O_2 pero no por el CN^- ; sin embargo las Mn-SODs son resistentes a ambos inhibidores (Corpas *et al.* 1998b; Palma *et al.* 2013).

7. Determinación de actividades enzimáticas en presencia de moduladores (agentes oxidantes, reductores, donadores de peroxinitrito y óxido nítrico).

Se realizaron diferentes ensayos *in vitro* tanto con agentes oxidantes y reductores como con donadores de óxido nítrico y peroxinitrito con las muestras de pimiento con el fin de establecer de qué forma eran moduladas las actividades de las enzimas GalLDH, APX, CAT, SOD y CCO.

Se llevaron a cabo ensayos a tiempos variables con muestras de pimientos California verdes y rojos a los que se les añadieron de manera individual la batería de moduladores (volumen total de la mezcla de 1 mL) tal y como se indica en la Tabla 7.

Table 7. *In vitro* treatments of antioxidant enzymes from pepper fruits with different potential modulators. Pepper fruit samples were incubated with different compounds under different conditions as indicated below. Then, the enzymatic activity was determined as indicated above. GalLDH, galactono-1,4-lactone dehydrogenase; CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase; CCO, cytochrome *c* oxidase; DTT, dithiothreitol; NEM, N-ethylmaleimide; GSH, glutathione; H₂O₂, hydrogen peroxide; SIN-1, 3-morpholiniosydnonimine; GSNO, S-nitrosoglutathione; DeaNONOate, diethylamine NONOate.

Enzyme	Modulator	Concentration (mM)	Incubation conditions	Others indications	Reference
GalLDH	SIN-1	0-5	25°C, 30'	Dark, stirring NAP™-5	(Begara-Morales <i>et al.</i> 2014)
	GSNO	0-2			
	GSH				
GalLDH	DTT	0-5	25°C, 5'	Dark, stirring NAP™-5	Present study
	NEM				
	H ₂ O ₂				
APX	SIN-1	0-5	25°C, 30'	Dark, stirring	(Begara-Morales <i>et al.</i> 2014)
	GSNO	0-2			
	GSH				
CAT	SIN-1	2	25°C, 45'	Dark, stirring	(Sun & Oberley 1989)
	DeaNONOate				
	DTT				
CAT	GSNO	0-6	25°C, 45'	Dark, stirring	(Sun & Oberley 1989)
	GSH				
	DTT				
SOD	SIN-1	4	25°C, 120'	Dark, stirring	(Holzmeister <i>et al.</i> 2015)
	GSNO				
	DeaNONOate				
SOD	GSH	10	25°C, 120'	Dark, stirring	(Holzmeister <i>et al.</i> 2015)
	H ₂ O ₂				
	DTT				
CCO	SIN-1	2	25°C, 120'	Dark, stirring	Present study
	GSNO				
	DeaNONOate				
CCO	GSH	5	25°C, 120'	Dark, stirring	Present study
	H ₂ O ₂				
	DTT				
CCO	KCN				

8. Electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA)

8.1. EGPA en condiciones desnaturalizantes (EGPA-SDS)

Fue utilizada la metodología descrita por Laemmli (1970) en la cual la muestra es desnaturalizada por calor en presencia de agentes desnaturalizantes. Este tipo de electroforesis minimiza la agregación molecular y asegura la disociación de las proteínas en sus subunidades polipeptídicas. La masa molecular de las proteínas se determina llevando a cabo una electroforesis en la que junto a la proteína problema se cargan varios patrones de proteínas con masas moleculares conocidas. El marcador molecular utilizado para todos los ensayos fue el *Precision Plus Protein Standards (Dual Color)* de Bio-Rad.

Se utilizó un equipo Mini Protean Tetra Cell de Bio-Rad. Se emplearon tanto geles Mini-Protean TGX gels (4-20%) de Bio-Rad ya preparados, o se elaboraron en el laboratorio con diferentes concentraciones de acrilamida (6-12%), y con un gel concentrador de poliacrilamida al 4% (p/v). Los geles separadores al 6-12% se prepararon en tampón Tris-HCl 375 mM, pH 8,9, glicerol 10 % (v/v) y SDS 0,1% (p/v). Para los geles concentradores al 4%, la acrilamida se preparó en tampón Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 0,1% (p/v). Las muestras para electroforesis se prepararon en un tampón de carga 4X compuesto por Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, SDS 8% (p/v), glicerol 40% (v/v), azul de bromofenol 0,006% (p/v) y DTT 10 mM, y se calentaron 5 min a 95°C. Después se cargaron en los geles, a los que se aplicó un voltaje de 100 V durante 15-20 min, para después subir a 200 V durante unos 45 min hasta que el frente se situó a 1 cm aproximadamente del borde inferior del gel. El tampón de electrodos usado para el cátodo fue Tris-HCl 0.025 M, pH 8,3, glicina 0,192 M y SDS 0,1% (p/v), y el tampón del ánodo de igual composición, pero sin SDS.

8.2. EGPA en condiciones nativas

En este tipo de electroforesis las proteínas no necesitan ser sometidas a desnaturalización, de forma que éstas migran en el gel en función de su carga, su forma y su tamaño.

Para llevar a cabo la electroforesis nativa se prepararon geles a diferentes concentraciones de poliacrilamida (6-12%) en función de la enzima objeto de estudio y se utilizó un equipo Mini- Protean Tetra Cell de BioRad. Los geles se prepararon en un

tampón Tris-HCl 375 mM, pH 8,9, con una relación acrilamida/bis de 19:1 y un grosor de 1,5 mm. Las muestras fueron cargadas directamente en el gel, tras añadirse azul de bromofenol al 0,006% (p/v) a las mismas. Para realizar la electroforesis se utilizó una intensidad de 15 mA por gel durante 30 min, y después se incrementó a 25 mA por gel hasta que el azul de bromofenol quedó a 1 cm del final del gel. El tampón de electrodos utilizado fue glicina 38 mM y Tris 5 mM a pH 8,9.

9. Isoelectroenfoque (IEF)

Para llevar a cabo esta técnica se siguió la metodología descrita por Palma *et al.* (1997). Se prepararon geles de 1,5 mm de grosor y acrilamida al 6 % que contenían 2,3% (p/v) de anfolitos con un rango de pH de 3,5-7 (Amersham), y glicerol al 10 % (v/v); como catalizadores se utilizó TEMED al 1% (v/v) y persulfato amónico al 0,023% (p/v). Las muestras se prepararon en una solución que contenía sacarosa 15% (p/v) y anfolitos al 2,3% (p/v) de pH 3,5-7. Una vez cargadas las muestras en los pocillos, sobre las mismas se depositó una capa de sacarosa al 7,5% (p/v) y anfolitos al 2,3% (p/v). Se utilizó un equipo Mini Protean II de BioRad para todo el procedimiento. Se prepararon dos soluciones de electrodos diferentes: el cátodo que contenía NaOH 0,1 M y el ánodo a base de ácido fosfórico al 0,06 % (v/v). El proceso electroforético se llevó a cabo a voltaje constante, comenzando a 150 V durante 30 min; tras este tiempo se incrementó el voltaje a 200 V durante otros 30 min y, finalmente, se aumentó a 250 V durante 1,5-2 h. Todo el proceso fue realizado a 4°C y se utilizaron los marcadores *IEF Standards* de BioRad, específicos para esta técnica.

10. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida

10.1. Azul Coomassie

Para la tinción de geles con azul Coomassie se utilizó la solución comercial *Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain* de Bio-Rad. Los geles fueron lavados en agua desionizada tres veces durante 5 min cada vez, e incubados con agitación en la solución de tinción mencionada anteriormente durante 1 h. Tras la incubación, los geles se lavaron con agua desionizada durante 30 min, tras los cuales aparecieron las bandas azules sobre el fondo transparente.

10.2. Nitrato de plata

Para la tinción con plata se siguió una modificación del método desarrollado por Heukeshoven and Dernick (1985). Una vez realizada la electroforesis los geles se enjuagaron tres veces con agua desionizada durante 5 min cada vez. Con el fin de fijar las proteínas en los geles, éstos se incubaron entre 1-3 h en una solución de etanol al 30% (v/v) y ácido acético glacial al 10% (v/v). Transcurrido este periodo de incubación se neutralizaron los geles con la misma secuencia de lavado que la anterior (3 x 5 min). El siguiente paso fue la reducción de los geles mediante una solución compuesta por ferricianuro potásico 1% (p/v) y tiosulfato de sodio 1,6 % (p/v). Posteriormente, se lavaron los geles con agua desionizada hasta que quedaron totalmente transparentes y se incubaron con nitrato de plata al 0,1% (p/v) durante 30 min en oscuridad. Finalizada la incubación se descartó la solución de nitrato de plata y se les fue añadiendo secuencialmente una solución de revelado que contenía carbonato sódico 0,3 M y formaldehído 0,02% (v/v), hasta ver la aparición de las bandas de proteínas sobre un fondo transparente. La reacción se detuvo añadiendo ácido acético al 3% (v/v).

11. Identificación de S-nitrosotioles proteicos en geles de poliacrilamida

Para la identificación de los S-nitrosotioles proteicos se utilizó el método descrito por King *et al.* (2005) con algunas modificaciones. Para el ensayo fueron utilizados geles preparados TGX de Bio-Rad Mini-Protean (4-20%). Antes de cargar las muestras, los geles fueron sometidos a un pre-recorrido de 30 min a 30 mA/gel. Los tampones de electrodos utilizados en este ensayo son los descritos en el apartado 8.1, si bien tanto al cátodo como al ánodo, se les añadió EDTA 1 mM.

Las muestras fueron preparadas en un tampón de carga Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, SDS 8% (p/v), glicerol 40% (v/v) y azul de bromofenol 0,006% (p/v) en una proporción 1:1. Seguidamente, se cargaron 20 µg por pocillo y se llevó a cabo la electroforesis a 15 mA/gel. Finalizada la misma, los geles se enjuagaron en agua ultrapura con EDTA 1 mM. Posteriormente, los geles fueron incubados con el fluoróforo DAF-FM (3-amino,4-aminometil-2'-7-difluoresceína) 28 µM, específico para detectar NO, durante 10 min a temperatura ambiente, en oscuridad. Tras la incubación, los geles fueron expuestos a luz UV en un transiluminador durante 5 min

aproximadamente. La luz ultravioleta rompe las uniones del NO a los aminoácidos liberándose de esta forma el NO. El NO liberado reacciona con el O₂ dando lugar a la formación de N₂O₃ y especies relacionadas que reaccionan con el DAF-FM provocando la emisión de fluorescencia (Fig. 20). Tras la exposición a UV se analizaron los geles en un equipo PharosFM™ System seleccionando una longitud de excitación de 488 nm y una longitud de emisión de 530 nm observándose las bandas fluorescentes de color verde correspondientes a los S-nitrosotioles protéicos.

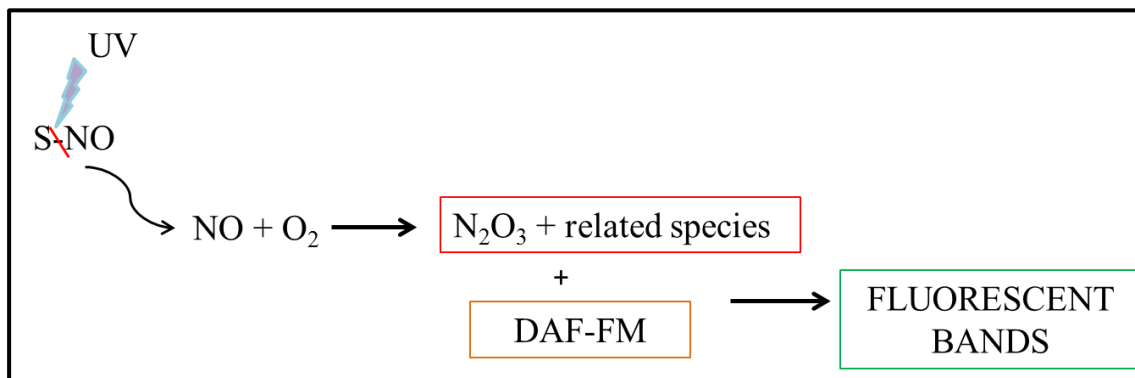


Figure 20. Basis of detection of protein S-nitrosothiols (SNO) in polyacrylamide gels using DAF-FM. Exposure of NO-proteins to UV light releases NO. Then, the released NO reacts with O₂ to form N₂O₃ and related species that react with DAF-FM, causing the dyes to fluoresce over nitrosylated proteins. The fluorescent bands were visualized using a fluorimager with an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 530 nm.

Para corroborar la especificidad del método y posibles artefactos experimentales en la detección de SNOs, se realizaron diferentes controles internos. Los controles se realizaron con incubaciones directas sobre las muestras y con incubaciones en los geles.

Las muestras de pimiento rojo se preincubaron durante 3 h a 25°C con diferentes agentes capaces de descomponer los SNOs o de bloquear los tioles libres, tales como ditioneitol (DTT) a una concentración de 20 mM, ascorbato 20 mM, CuCl 0,1 mM, N-etilmaleimida (NEM) 5 mM, glutatión reducido (GSH) 20 mM, β-mercapetanol (βME) 100 mM y radiación UV. Tras las incubaciones, se realizó el revelado siguiendo el método descrito anteriormente.

Para los controles realizados directamente sobre los geles se utilizó como agente secuestrador de NO el 2-4-carboxifenil-4,4,5,5-tetrametilimidazoline-1-oxil-3-óxido (cPTIO). Finalizada la electroforesis se incubó el gel con cPTIO (10 mM) durante 30 min a temperatura ambiente, tras esta incubación se siguió el mismo procedimiento para

el análisis de SNOs descrito hasta ahora. Se realizó un ensayo en el cual no se aplicó ni cPTIO ni radiación UV para comprobar que no se estaba produciendo ninguna interferencia en el proceso.

12. Determinación del tamaño molecular nativo de la catalasa

12.1. Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida

Para la determinación del tamaño molecular de la catalasa de frutos de pimiento se siguió el método descrito por Hedrick and Smith (1968). Se realizaron una serie de electroforesis en condiciones nativas en geles de poliacrilamida a diferentes concentraciones (5-7%), tal y como se especifica en el apartado 8.2. Para cada una de las electroforesis realizadas se utilizaron dos geles: en uno se cargaron proteínas comerciales de masa molecular conocida (patrones), y en el otro, distintas muestras de extractos de frutos de pimiento. Finalizadas las electroforesis, los geles con las proteínas patrón se tiñeron con azul Coomassie (apartado 10.1) y en los otros se detectó la actividad catalasa isoenzimática tal y como se especifica en el apartado 6.2; seguidamente, se determinó el R_f de cada una de las bandas, tanto de las proteínas patrón en los geles teñidos con azul Coomassie como de las isoenzimas de catalasa en los geles de actividad. Se define el R_f como el cociente entre la distancia de migración de cada proteína, tanto patrón como isoenzimas de catalasa /distancia de migración del frente electroforético. A continuación, se representó el algoritmo $100 \log (R_f \times 100)$ de cada una de las proteínas (patrón e isoenzimas) frente al porcentaje de concentración de acrilamida. El valor de las pendientes obtenidas para cada proteína patrón se representó frente a sus respectivas masas moleculares y, sobre la gráfica obtenida se interpoló el valor de las pendientes de las isoenzimas de catalasa. Se estimó de esa manera el tamaño hipotético de la catalasa de fruto de pimiento en su forma nativa. Para el ensayo se utilizó como proteína patrón la albumina de suero bovino (BSA) (Albumin, Bovine 98%, Sigma) y catalasa pura (*catalase from bovine liver*, Sigma, CAT). Dichas proteínas se prepararon en una concentración de $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ en agua milliQ para la BSA y $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ para la catalasa pura. Para cargarlas en los geles, las muestras se prepararon con glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0,006% (p/v) y se cargaron $12 \mu\text{g}$ de BSA y $6 \mu\text{g}$ de CAT en los pocillos. En el caso de las muestras de pimiento, las muestras se prepararon como se indica en el apartado 8.2.

12.2. Filtración molecular mediante cromatografía por FPLC

Alternativamente, se empleó la cromatografía líquida por filtración molecular en un equipo de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) para la determinación de la masa molecular de la catalasa de los frutos de pimiento. Para ello, se prepararon homogenados de frutos verdes en el tampón indicado anteriormente, empleando una relación 1:2 (material vegetal:tampón). El homogenado se filtró a través de dos capas de nylon y se centrifugó a 20.000 g durante 30 min para eliminar partículas insolubles y restos celulares. El sobrenadante se sometió a una precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20-80%). De manera resumida, al sobrenadante obtenido tras la centrifugación inicial se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 20% (p/p) en frío durante 30 min. La mezcla se centrifugó a 20.000 g durante 20 min y al sobrenadante resultante se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta el 80% (p/p). Esta última mezcla se centrifugó de nuevo a 20.000 g durante 20 min, eliminándose el sobrenadante. El precipitado obtenido se disolvió en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y la solución obtenida se volvió a centrifugar en las condiciones indicadas anteriormente. El sobrenadante se pasó por columnas PD10 para eliminar los restos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Posteriormente, de la suspensión eluida de las columnas se cargaron 200 μL en una columna de Superose 12 Pharmacia, acoplada a un equipo de FPLC (Äkta, Amersham, Upsala, Suecia) y se eluyó y se recogió en fracciones de 500 μL . En ellas se midió la absorbancia a 280 nm y la actividad catalasa por el método de medida de descomposición del peróxido de hidrógeno a 240 nm (Aebi 1984). Igualmente las fracciones obtenidas se analizaron por EGPA-SDS y transferencia de western empleando un anticuerpo frente a catalasa (dilución 1:1000).

Para la calibración de la columna de Superosa 12 se emplearon las proteínas patrón Rubisco ($P_m = 560.000$ Da), ferritina ($P_m = 450.000$ Da), aldolasa ($P_m = 160.000$), fosforilasa *b* ($P_m = 97.600$) y mioglobina ($P_m = 18.700$). Se preparó una solución con todas estas proteínas en una concentración de 1 mg/mL de cada una de ellas en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Se cargaron 200 μL en la columna y se recogieron fracciones de 500 μL . En las fracciones eluidas se determinó la concentración de proteínas por la absorbancia a 280 nm y con los datos de los respectivos pesos moleculares y el volumen de elución se elaboró una recta de regresión donde se interpoló el volumen de elución de la catalasa de frutos de pimiento.

13. Electroelución de proteínas de los geles de poliacrilamida

Para esta técnica, se cortaron las bandas correspondientes a las proteínas de interés de los geles de acrilamida y se trocearon en piezas de aproximadamente 1 mm². Los trozos de gel se dispusieron en los tubos de vidrio del equipo, según se muestra en la Fig. 21. Se utilizó un equipo 422 Electro-eluter de Bio-Rad y, para llevar a cabo la electroelución, se aplicó una intensidad constante de 10 mA por tubo, durante 5-6 h. El tampón de electrodos estaba compuesto por Tris 25 mM, pH 8,6, glicina 192 mM y SDS 0,1% (w/v), y se utilizaron membranas de Bio-Rad de 12.000 Da de corte. Las proteínas electroeluidas y recogidas en las cápsulas que contenían las membranas se concentraron utilizando tubos de concentración Nanosep 10K de Pall Corporation, siguiendo las instrucciones del fabricante.

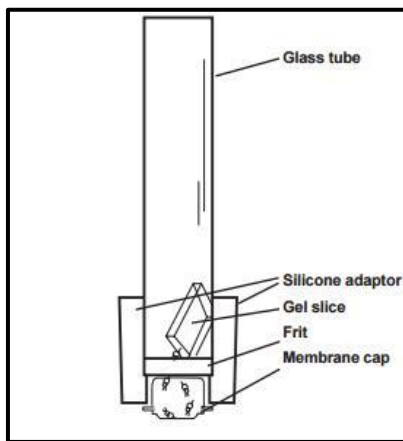


Figure 21. Side view of Model 422 electro-eluter assembly. Macromolecules are carried by the electrical current out of the gel slice, through the frit and into the membrane cap (www.bio-rad.com).

14. Transferencia e inmunodetección de proteínas (*western blotting*)

14.1. Transferencia de proteínas

Para la transferencia de proteínas se utilizaron varios métodos: las proteínas separadas por EGPA-nativa se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) de 0,45 µm, utilizando el sistema de transferencia semiseco Tran-Blot SD de Bio-Rad. El tampón utilizado en la transferencia fue CAPS 10 mM, pH 11,0 con metanol 10% (v/v). Las membranas fueron activadas con metanol 100% (v/v) debido a su naturaleza hidrofóbica. Una vez activadas fueron lavadas con agua ultrapura durante 2 min para posteriormente equilibrarlas con el tampón de transferencia. Para realizar la transferencia se prepararon papeles “Extra Thick Blot Paper” de Bio-Rad que fueron equilibrados con el tampón de transferencia y mantenidos a 4°C hasta el ensamblaje de

todos los componentes del dispositivo. La transferencia se desarrolló aplicando una intensidad de 1,5 mA/cm² de membrana durante 2 h, según Corpas *et al.* (1998a).

Las proteínas separadas por EGPA-SDS fueron transferidas a membranas de PVDF de 0,2 μm utilizando el sistema de transferencia Blot® Turbo™ de Bio-Rad. Para este tipo de transferencia se utilizó el kit Trans-Blot Turbo PVDF/ Nitrocellulose (Mini format) de Bio-Rad siguiendo las instrucciones del comerciante. La transferencia se llevó a cabo a una intensidad de 1,5 mA/cm² de gel, 25 V, durante 7 min.

Para la visualización de las proteínas transferidas, una vez finalizada la transferencia, las membranas se sumergieron en una solución de Rojo Ponceau al 0,2% (p/v) en ácido tricloroacético al 3% (p/v), durante 5 min, lavándose después con agua destilada hasta eliminar totalmente el colorante. A continuación las membranas se procesaron para detección de proteínas mediante el empleo de anticuerpos específicos.

14.2. Inmunodetección de proteínas por quimioluminiscencia

Para la detección específica de las proteínas transferidas a la membrana de PVDF se utilizó un método de quimioluminiscencia. Finalizada la transferencia, las membranas fueron lavadas con agua destilada para, seguidamente, incubarlas durante 1 h a temperatura ambiente con leche en polvo desnatada al 5% (p/v), preparada en tampón TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, NaCl 0,18 M). Con este paso se asegura el bloqueo en las membranas de aquellos sitios inespecíficos de unión de las inmunoglobulinas. Tras el periodo de bloqueo las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 min cada una con TBST [Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, NaCl 0,18 M, Tween 20 0,1% (v/v)]. Tras el lavado de las membranas, se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo primario correspondiente, en la dilución adecuada, durante toda la noche a 4°C, o durante 2 h a temperatura ambiente.

Finalizada la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron en TBST 30 min (3 x 10 min), tras lo cual se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG unida a peroxidasa de rábano (Bio-Rad) (dilución 1:8000). Las membranas se lavaron finalmente con TBST y se procedió a la detección de las proteínas utilizando el kit de revelado “Clarity™ Western ECL Substrate” de Bio-Rad que incluía el sustrato de la peroxidasa, de manera que, en presencia de la enzima, se genera emisión de luz según se muestra en la Fig. 22. Para el

análisis de las membranas se utilizó el equipo ChemicDoc™ XRS de Bio-Rad. El anticuerpo secundario utilizado en todos los ensayos fue Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Horseradish Peroxidase Conjugate de Bio-Rad.

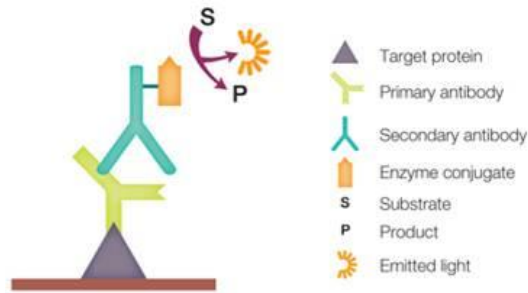


Figure 22. Chemiluminescence detection in PVDF membranes after protein transfer (source: <http://www.bio-rad.com/>)

15. Purificación por afinidad de la IgG

Se realizaron geles en condiciones desnaturizantes al 8% de acrilamida (apartado 8.1) para separar las proteínas y se transfirieron a una membrana de PVDF según las condiciones indicadas en el apartado 14.1. Las proteínas se visualizaron con rojo Ponceau al 0,2% (p/v). Posteriormente, en las membranas de PVDF se cortaron las bandas correspondientes a las proteínas de interés. Las tiras de membrana cortadas se lavaron en tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM (PBS) para eliminar por completo el colorante.

Tras los lavados, las tiras de PVDF se incubaron en un tampón PBS con BSA 5% (p/v) durante 1-3 h con agitación continua. Finalizada esta incubación, las bandas se lavaron con PBS 3 veces (5 min cada lavado) y se incubaron de 1 a 3 h con anticuerpo primario, diluido 1:20 en PBS con 0,1% (p/v) de BSA. Transcurrido este tiempo, se lavaron las bandas con PBS-0,1% BSA 3 veces (10 min cada lavado) y las IgGs se eluyeron incubando las tiras de membrana en 1,5 ml de tampón glicina-HCl 0,2 M, pH 2,7, EGTA 1 mM, durante 10 min con agitación constante. Finalmente, la solución con el anticuerpo se neutralizó con un volumen igual de Tris-HCl 0,2 M, pH: 8,0, BSA 0,2% (p/v) y ázida sódica 0,02% (p/v).

16. Extracción, derivatización y análisis de metabolitos mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS).

16.1. Extracción

Para el análisis de metabolitos se siguió el método descrito por Roessner *et al.* (2000) al cual se le realizaron una serie de modificaciones con el fin de poner a punto el método para las muestras de frutos de pimiento. Para la extracción, las muestras (0,2 g) se pesaron, se trituraron con mortero y pistilo, se homogeneizaron en 1 mL de metanol 100 % y 120 μL de ribitol $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, que se utilizó como patrón interno (P.I), y se mantuvieron a 4°C . Posteriormente, a las muestras se le añadió 400 μL de agua ultrapura y fueron centrifugadas a 16.800 g durante 2 min a 4°C en una centrífuga Sorvall Legend Micro 17R (Thermo Fischer). Tras la centrifugación se tomaron 5 μL y 100 μL de sobrenadante que fueron llevados a sequedad durante 3 h sin calor, utilizando un sistema Speed-Vacuum. Finalizado este proceso las muestras fueron derivatizadas inmediatamente o conservadas a -80°C hasta su posterior análisis. Para la puesta a punto del método se realizó un ensayo de recuperación con los siguientes patrones seleccionados: D-(+)-glucosa, ribitol (P.I), mio-inositol, L-treonina, oxalato de sodio, D-(-)-fructosa, D-(+)-galactosa, L-ácido glutámico, L-(+)-ácido tartárico, ácido γ -aminobutírico (GABA) y deshidroascorbato (DHA). Se prepararon las soluciones de estos compuestos en agua ultrapura Milli-Q con una concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

16.2. Derivatización

Para la derivatización de las muestras, a los liofilizados de las muestras se les añadió 60 μL de metoxiamina preparada a 20 mg/mL en piridina, y se incubaron con agitación a 37°C durante 1 h y 30 min. Finalizada la incubación se centrifugaron a 16.800 g durante 30 s a temperatura ambiente en una centrífuga Sorvall Legend Micro 17R (Thermo Fischer), recuperándose los sobrenadantes. A continuación se les añadió a éstos 120 μL de MSTFA [N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida] y se incubaron a 37°C durante 30 min. Finalizada esta última incubación se transfirieron 190 μL a diferentes viales. Las muestras se dejaron reposar unas 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad, para posteriormente ser analizadas por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS).

16.3. Análisis de muestras por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS)

Para el análisis, se inyectó 1 μL de cada muestra derivatizada en un equipo de cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS) Varian 450-GC 240 MS. La cromatografía de gases se llevó a cabo a través de una columna TG-5MS (20 m x 0,15 mm, y 0,15 μm de diámetro interno) de dimetil:fenil 95% : 5%. La temperatura de inyección se realizó a 230°C en Split 1:50 con pulso de presión 30 psi durante 0,2 min: El gas utilizado fue el helio a un flujo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. El programa de temperaturas fue de 70°C durante 5 min, seguido de incrementos continuos de 5°C hasta alcanzar los 250°C, y posteriores segmentos de 20°C hasta alcanzar los 310°C, temperatura que se mantuvo durante 1 min. La detección se realizó por ionización de impacto electrónico y los cromatogramas fueron registrados en modo TIC *full scan* con rango de adquisición de masas entre 50-600 m/z. La evaluación de los cromatogramas y los espectros de masas se realizó usando la base de datos NIST08 del software MS Workstation 6.9.1 utilizando los tiempos de retención de los patrones puros.

17. Otras determinaciones bioquímicas

17.1. Contenido de ascorbato y glutatión

Para la determinación de ascorbato y glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) se siguió el método descrito anteriormente por Airaki *et al.* (2011). El endocarpio de pimiento (0,4 g) fue homogeneizado en 1,3 mL de HCl 0,1 N. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 15.000 g durante 15 min a 4°C, y los sobrenadantes fueron filtrados a través de filtros de PVDF de 0,22 μm . Seguidamente, las muestras fueron analizadas mediante cromatografía líquida y electrospray/espectrometría de masas (HPLC-ES/MS) usando un equipo Allience 2695 HPLC de Waters conectado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo Quatro micro API de Micromass. La columna utilizada en el ensayo fue una Atlantis® T3 3 μm , 2,1 x 100 mm de Waters. Para el control, adquisición y análisis de datos se utilizó el paquete de software MassLynx 4.1. La concentración de ascorbato y glutatión fue calculada usando estándares externos y fue expresada como mg de ácido ascórbico y mg de GSH y GSSG por 100 g de peso fresco de frutos. Todas las operaciones llevadas a cabo a lo largo del

análisis se realizaron a 4°C y en semioscuridad para evitar la degradación de los analitos.

17.2. Peroxidación lipídica

Para el análisis de la peroxidación lipídica se determinó la tasa de formación de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), empleando para ello el malondialdehído (MDA) como compuesto de referencia (Buege & Aust 1978). Para el ensayo se añadieron 200 µL de muestra diluida a 1 mL de la siguiente mezcla de reacción: ácido tricloroacético 15% (p/v), y ácido tiobarbitúrico 0,375 % (p/v) en HCl 0,25 N. Posteriormente, la mezcla se calentó durante 15 min a 97°C, se dejó enfriar y se centrifugó a 1100 g durante 5 min a 25°C en una centrífuga Hettich. En el sobrenadante se efectuó la lectura de densidad óptica a 535 nm. Los valores obtenidos se enfrentaron a una recta de calibración con distintas concentraciones de MDA (0,1-20 µM), para determinar la tasa de peroxidación lipídica de las muestras. Todas las soluciones y reactivos fueron preparados con agua Milli-Q para este ensayo.

La detección de peroxidación lipídica a nivel de tejidos se realizó utilizando el reactivo de Schiff, que detecta los aldehídos originados a partir de peróxidos lipídicos (Yamamoto *et al.* 2001). Se incubaron las muestras en el reactivo de Schiff durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se descoloraron por inmersión en etanol puro hervido hasta la aparición de una coloración violeta, lo que indicaba la presencia de peroxidación lipídica en los tejidos.

17.3. Determinación de carotenos y clorofilas en extractos de frutos de pimiento

Para la determinación del contenido de carotenos y clorofilas totales, se realizaron extractos de pimiento verde, rojo y envero. Se prepararon extractos a partir de 1 gramo de pimiento en 1 mL de tampón-K 50 mM a pH 7,8.

Al extracto se le añadieron 4,5 ml de acetona hasta una concentración del 85% (v/v), y dicha mezcla se agitó y se dejó enfriar a 4°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12.300 g durante 10 min a 4°C en una centrífuga Hettich. Finalizada la centrifugación, los sobrenadantes se analizaron a las siguientes longitudes de onda: 480 nm, 663 nm, 645 nm y 652 nm.

El contenido de carotenos totales expresados en mg/g fruto se calculó siguiendo el método descrito por Davies (1976), empleándose las siguientes ecuaciones:

$$(\text{mg carotenos /mL}) = \frac{E_y}{E_{1 \text{ cm}}^{1\%} \times 100} \times \frac{1}{\text{vol. Muestra}}$$

Donde $E_y = \Delta E_{480}^{\text{car}} = \Delta E_{480} + 0,114 \Delta E_{663} - 0,638 \Delta E_{645}$, y $E_{1 \text{ cm}}^{1\%} = 2500$ siendo este último el coeficiente de extinción para una solución que contenía 1% de carotenos (1 g/100 ml).

Para el cálculo de clorofilas totales expresadas también en mg/g fruto se siguió la metodología descrita por Arnon (1949), empleándose la siguiente ecuación:

$$(\text{mg clorofilas /mL}) = \frac{E_{652} \times 1000}{34,5} \times \frac{5}{v \times 1000}$$

En la que E_{652} es la absorbancia a esa longitud de onda y (v) es el volumen de muestra.

17.4. Concentración de proteínas

El método utilizado para la cuantificación de proteínas fue el descrito por Bradford (1976), el cual implica una reacción colorimétrica entre el *Coomassie Brilliant Blue G-250* y la proteína. Con este método se mide el incremento de absorbancia que se produce a 595 nm, que es proporcional a la concentración de proteínas. Para la cuantificación de proteínas se preparó una curva patrón con albumina de suero bovino (BSA), fracción V (Roche) y se empleó el reactivo comercial “*Protein assay dye reagent concentrate*” de Bio-Rad.

Para 1 mL de volumen final de reacción, se añadían 200 μL del reactivo de Bio-Rad a 800 μL que contenían la muestra (2-10 μL) y agua ultrapura. Esta mezcla se incubó durante 5-10 min a partir de los cuales se comenzó la medida de la absorbancia. Con los valores de absorbancia y de concentración de la BSA se elaboró una recta de regresión lineal en la que se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras para calcular la concentración de proteínas de las mismas.

18. Extracción, cuantificación y análisis de RNA

18.1. Extracción de RNA total

Para llevar a cabo el aislamiento de RNA se utilizó el reactivo comercial Trizol[®] Reagent (Gibco BRL, Life Technologies). Los frutos se homogeneizaron en un mortero con nitrógeno líquido, pesándose el polvo obtenido y añadiendo inmediatamente el Trizol (1 mL de Trizol por cada 100 mg de tejido). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5-10 min. Tras la incubación se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min a 4°C. Finalizada la centrifugación se añadió cloroformo (0,2 mL por mL de Trizol utilizado) y se agitó vigorosamente unos 15 s, volviéndose a incubar durante 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4°C y se obtuvieron dos fases, una acuosa, superior, donde se encuentra el RNA, y otra inferior de fenol-cloroformo. La fase acuosa se recuperó y se le añadió isopropanol (0,5 mL por cada mL de Trizol), se agitó vigorosamente y se dejó incubando durante 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4°C. En este paso se obtuvo el precipitado de RNA con el cual se trabajó. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol 75% (v/v), se agitó por inversión y se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4°C. Finalmente, se dejó secar el precipitado durante unos minutos a temperatura ambiente, y se resuspendió en agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC) al 0,1% (v/v).

18.2. Cuantificación de RNA

La cuantificación del RNA obtenido se realizó espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia a 260 nm con un equipo Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer. Se realizó un barrido de absorbancia entre 200 y 300 nm para determinar la posible contaminación de proteínas, que absorben a 280 nm. En estas condiciones, la relación entre absorbancias A_{260}/A_{280} debe estar comprendida entre 1,8 y 2 para el RNA. Para la cuantificación, se asumió que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/mL de RNA.

18.3. Electroforesis en geles de agarosa

Se realizaron electroforesis de geles de agarosa para comprobar el estado del RNA y de los productos de PCR.

Para la comprobación del RNA se realizaron geles al 0,8% (p/v) de agarosa que se disolvió en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, pH 8,0, ácido acético 0,15% (v/v), EDTA-Na 2 mM) con ayuda de un microondas, y se dejó polimerizar, durante 30-45 min. Alicuotas de 1 µg de RNA de cada muestra se mezclaron con 2 µL de tampón de carga [glicerol 25% (v/v), EDTA-Na₂ 1 mM, pH 8,0, xileno-cianol 0.25% (p/v), azul de bromofenol 0,25 (p/v) y Gel Red™ (Nucleic Acid Gel stain 10000X) 0,01% (v/v)]. El volumen final de carga se ajustó a 10 µL con agua Mili-Q tratada con DEPC. Para la electroforesis se utilizó una intensidad de 100 V durante 30 min en un tampón TAE. Finalizado la electroforesis se visualizaron las bandas usando un equipo GelDoc-It^{TS3} Imager (UVP).

Para los productos de PCR se prepararon geles que oscilaban entre 0,8 y 2% (p/v) de agarosa en tampón TAE. Se mezcló un volumen de 15 µL de cada muestra con 3 µL del tampón de carga indicado anteriormente. La electroforesis se realizó a 100 V durante 30-120 min en un tampón TAE. Como marcador de tamaño molecular se empleó 100 bp DNA Ladder, de Biotools. El gel se incubó en un baño de Gel Red™ (1µL de Gel Red (10000X) / 10 mL H₂O desionizada) durante 15-30 min en oscuridad y posteriormente se visualizaron los resultados.

19. Síntesis de cDNA, PCR semicuantitativa y PCR cuantitativa a tiempo real

19.1. Obtención de cDNA por transcripción inversa (RT)

A partir del RNA obtenido de los frutos de pimiento se obtuvo el cDNA. Se partió de 3 µg de RNA total, a los que se les añadió 1,6 µg de oligo-dT (de 23 pb) (New England BioLabs). Se incubó a 70°C durante 10 min, y posteriormente se adicionaron los siguientes reactivos: dNTPs 1,5 mM, 0,03 U/µl de RNasin™ (inhibidor de RNasas, FINNZYMES), tampón (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, MgCl₂ 5 mM, KCl 50 mM y DTT 2 mM) y 0,65 U/µl de transcriptasa inversa (AMV Reverse Transcriptase, FINNZYMES), en un volumen final de 30 µL. La reacción se llevó a cabo sucesivamente durante 40 min a 42°C, 5 min a 98°C, y otros 10 min a 4°C.

19.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Px2, de Thermo. La reacción se realizó a partir de los cDNAs obtenidos por RT. La mezcla de reacción fue la siguiente: 20-30 ng de cDNA, dNTPs 0,25 mM, tampón de reacción Tris-HCl 750 mM pH 9, KCl 500 mM, y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 200 mM, MgCl_2 2 mM, 1 U/ μl de la enzima DNA polimerasa (Hotsplit Biotools), y 0,25-0,5 μM de cada cebador específico, en un volumen final de 20 μL .

19.3. PCR semicuantitativa

Para el estudio de la expresión de los genes de las enzimas GalLDH y GSNOR de los frutos de pimiento, se utilizó la técnica de la PCR semicuantitativa (Marone *et al.* 2001). Esta técnica permite comparar la cantidad de un mRNA determinado entre muestras distintas, ya que si la reacción de PCR se detiene en aquella zona en la que la cantidad de DNA amplificado aún se encuentra en la zona exponencial, la intensidad de las bandas amplificadas es proporcional a la cantidad inicial del cDNA en la muestra. Como gen control se utilizó la *actina* ya que su expresión es constitutiva y, por tanto, no varía en las diferentes situaciones. Esto permite normalizar la intensidad de las bandas con respecto a este control interno, y minimizar de esta forma el error experimental.

Tras la obtención del cDNA, se cuantificó tal y como se especifica en el apartado 18.2 y se prepararon alícuotas con la misma concentración de cDNA, y poder realizar los ensayos partiendo de las mismas condiciones.

Para la realización de la PCR se emplearon una serie de ciclos y temperaturas de hibridación variables, dependiendo de la pareja de cebadores específicos que se utilizaron. Los cebadores diseñados para las PCR semicuantitativas se especifican en la Tabla 8.

El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente:

- 1- Se realizó una mezcla con todos los reactivos a excepción del cDNA y los cebadores.
- 2- Se repartió esta mezcla en volúmenes correspondientes a dos reacciones de PCR, y a estos volúmenes se les añadió 60 ng de cDNA. Las mezclas resultantes se volvieron a dividir en otros dos alícuotas más.

- 3- A cada tubo se le añadieron los cebadores específicos, bien los del gen control (*actina*) o los del gen problema.

Table 8. Primers used for semiquantitative PCR. *GalLDH*, galactono-1,4-lactone dehydrogenase; *GSNOR*, nitrosogluthathione reductase; *Act*, actin.

Primers	Sequences	Size (bp)	Access number
F- <i>GalLDH</i>	5'-TTACTCTTCAGAACTTTGC-3'	388	AY547352
R- <i>GalLDH</i>	5'-GGATTGCATGTCACAACCAC-3'		
F- <i>GSNOR</i>	5'-CTTGACAAAGTATGTGTCC-3'	333	EU652335
R- <i>GSNOR</i>	5'-GTGAGTGTAGAACTTCTCC-3'		
F- <i>Act</i>	5'-ACTCTTAATCAATCCCTCCC-3'	573	AY572427
R- <i>Act</i>	5'-GCACTGTATGACTGACACC-3'		

Cada reacción, con un volumen final de 20 μ L, se llevó a cabo de la siguiente forma: 1 μ L de cDNA (30 ng), 0,25 mM dNTPs, tampón de reacción con $MgCl_2$ 2,5 mM, 0,5 U de polimerasa (HotMaster Taq™ DNA polimerase, Eppendorf) y 0,5 μ M de cada cebador. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Px2 (Thermo). Posteriormente los productos de PCR fueron detectados por electroforesis en geles de agarosa al 0,8-2 % (p/v) en tampón TAE.

19.4. PCR cuantitativa a tiempo real

Con esta técnica es posible cuantificar la cantidad inicial de ácidos nucleicos en una muestra. Esta cuantificación se realiza con el valor del incremento de fluorescencia durante la fase exponencial de la PCR, obtenido de medidas realizadas en cada ciclo de amplificación. En la PCR a tiempo real el número de copias puede cuantificarse en base al ciclo umbral (*Ct*, *threshold cycle*), que se define como el número de ciclos al cual la fluorescencia se incrementa de forma significativa sobre el ruido de fondo.

Para el análisis de los niveles de expresión del gen de la *GalLDH*, se aisló RNA de frutos de pimiento verde y rojo, así como de los frutos sometidos a tratamiento con NO tal y como se especifica en el apartado 18.1. El RNA fue convertido a cDNA mediante transcripción inversa.

La PCR se llevó a cabo en placas de 96 pocillos en un termociclador iCycler (BioRad). La mezcla de reacción, en un volumen final de 25 μ L, consistió en tampón de reacción Tris-HCl 20 mM, pH 8,4 y KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, cebadores 200 nM (Tabla 9), 1U de DNA polimerasa (Platinum® Taq DNA Polimerase, Invitrogen), dNTPs 0,2 mM (cada uno), 2,5 μ L de SYBR Green I (Molecular Probes), diluido 10.000X en DMSO, y 1 μ L de cDNA. La mezcla de reacción se homogeneizó convenientemente, y se transfirieron alícuotas de 23 μ L a cada pocillo de la placa. Para cada muestra individual, y para cada pareja de cebadores, se prepararon 6 repeticiones de la reacción de la PCR. Todo el proceso de manipulación se llevó a cabo a 4 °C. Se incluyó un control negativo de la PCR (sin cDNA). El programa para la amplificación consistió en 1 ciclo de 3 min a 95°C y de 40 ciclos de 30 s de desnaturalización a 95°C, 30 s de hibridación a 67,2°C y 40 s de extensión a 72°C, siendo esta última etapa en la que se midió la fluorescencia. Además, para estudiar la curva de Melt, se añadió un ciclo de 1 min a 95 °C, otro de 1 min a 70 °C, y 60 ciclos de 10 s a 70°C.

Table 9. Primers used for real time PCR for *GalLDH* expression in different organs of pepper plants. *GalLDH*, galactono-1,4-lactone dehydrogenase; *Act*, actin.

Primers	Sequences
Q-F- <i>GalLDH</i> 1P	5'-GTTACTGTACAAGCTGGGATTCGGGTTC-3'
Q-R- <i>GalLDH</i> 1P	5'-GGTAACCAGTTCATGCTTATGACTTGCTC-3'
Q-F- <i>Act</i> 1PP	5'-CAAACAGGTTTTTAAAAGATGGCAGATGAAG-3'
Q-R- <i>Act</i> 1PP	5'-TCCTTTTGACCCATCCCTACCATAACAC-3'

19.5. Análisis de datos

Para el análisis de los datos obtenidos mediante la técnica de PCR a tiempo real se aplicó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak and Schmittgen (2001) en el cual se analizan los cambios de expresión del gen del interés frente a un gen constitutivo o gen control (*actina*). Los valores de Ct para los distintos genes se obtuvieron utilizando el programa iCycler IQ versión 3.0 (Bio-Rad). Para el análisis de expresión relativa se aplicó la siguiente ecuación:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen constitutivo})_{PV} - (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen constitutivo})_{PR}$$

Donde PV se refiere a los valores en pimiento verde y PR a los de pimiento rojo.

Esta fórmula se puede aplicar siempre que las eficiencias de la amplificación del gen problema y del gen constitutivo sean aproximadamente iguales entre sí y próximas a 1.

20. Análisis estadísticos.

En todos los análisis comparativos entre los valores de los experimentos que se realizaron durante esta tesis se empleó el programa Statgraphics con el que se aplicaron los paquetes estadísticos de *t*-Student y ANOVA.

21. Análisis de imágenes

Para el tratamiento de imágenes, así como para el análisis de las mismas, se empleó el programa Image-J.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZACIÓN DE CATALASA Y PEROXIDASAS DE FRUTO DE PIMIENTO

CHAPTER 1

CHARACTERIZATION OF CATALASE AND PEROXIDASES FROM PEPPER FRUITS

1.1. INTRODUCCIÓN/ INTRODUCTION

El objetivo perseguido en este capítulo fue la caracterización bioquímica y molecular de los sistemas enzimáticos antioxidantes implicados en la eliminación de peróxido de hidrógeno en frutos de pimiento en distintos estados de maduración (verde y rojo), fundamentalmente catalasa y peroxidasas.

Los frutos son una fuente importante de nutrientes, vitaminas y minerales esenciales en la dieta humana (Martí *et al.* 2009). Debido a sus características fisiológicas, estos presentan un intenso metabolismo que persiste durante todo el proceso de maduración y post-cosecha, lo que les hace ser bastante perecederos. No obstante, esta peculiaridad podría suponer un problema desde el punto de vista comercial y de transporte si no se aplican buenas prácticas ya que pueden repercutir en la calidad de los frutos (Kumar *et al.* 2014). Es precisamente el gran interés de las compañías agroalimentarias y la fuerte demanda de los consumidores lo que hace esencial el estudio y el análisis de los procesos que tienen lugar en las etapas de maduración y post-cosecha de los frutos de interés agronómico (Palma *et al.* 2011a). El pimiento es rico en vitaminas C (ácido ascórbico), pro-vitamina A (caroteno) y potasio (Palma *et al.* 2016). De hecho, la ingesta de 50-100 gr de fruto en fresco aportarían el 100% y el 60% de las cantidades diarias recomendadas de vitamina C y A, respectivamente (Howard *et al.* 2000; Palma *et al.* 2011b; Mateos *et al.* 2013). Por tanto, aumentar el conocimiento que ayude a establecer estrategias para mantener estas propiedades nutricionales del fruto de pimiento durante la maduración y en las etapas post-cosecha ha sido una de las motivaciones de esta Tesis Doctoral.

La **maduración** en frutos es un proceso complejo en el cual tienen lugar diferentes cambios de expresión de genes, bioquímicos y fisiológicos, tales como la degradación de clorofilas, los cambios en la pigmentación, conversión de los azúcares o alteraciones en la turgencia, entre otros. Los cambios asociados a este proceso han sido estudiados a lo largo de los años en diversidad de frutos con el fin incrementar la información sobre la maduración ya que ésta puede estar influenciada por el tipo de fruto, ya sea climatérico o no-climatérico, aunque no parece guardar relación con el grupo taxonómico (Palma *et al.* 2011a). Debido a la cantidad de cambios metabólicos que tienen lugar durante la maduración es necesaria la aplicación de diferentes técnicas para evaluar la evolución natural de este proceso. Por otro lado, se ha observado que los

frutos se ven sometidos a cambios metabólicos, no solo durante la maduración, sino también provocados por estreses medioambientales (frío, altas temperaturas, etc); en los periodos post-cosecha y también durante el almacenamiento tienen lugar una serie de reacciones bioquímicas y modificaciones fisiológicas en los tejidos internos que provocan cambios en las membranas y las paredes celulares, destacando la pérdida de turgencia y generando una caída en los valores nutricionales del fruto (Kan *et al.* 2011).

Por tanto, es imprescindible tener un conocimiento y una visión más detallada de la dinámica antioxidante durante las distintas etapas clave como son la maduración o el almacenamiento de los frutos, ya que a lo largo de estos procesos el fruto está sometido a un estrés que puede ocasionar un aumento en el nivel de ROS, lo que conllevaría a un deterioro general en el metabolismo celular debido a la pérdida gradual de la capacidad de los sistemas antioxidantes de neutralizar el daño oxidativo (Mondal *et al.* 2003; Mondal *et al.* 2004; Martí *et al.* 2009; Mondal *et al.* 2009; Kumar *et al.* 2014). De hecho, la producción de ROS durante la maduración y la post-cosecha juega un papel esencial en la biosíntesis de carotenoides y en la transformación de cloroplastos a cromoplastos, entre otros fenómenos (Martí *et al.* 2009; Palma *et al.* 2011a). Durante la senescencia o en estados avanzados del desarrollo tiene lugar, a su vez, un proceso oxidativo en el cual las estructuras celulares así como algunas enzimas son degradadas generando todo esto un aumento de la peroxidación lipídica o de la oxidación de proteínas, siendo ésta una de las principales causas en el deterioro de la calidad de los frutos (Jiménez *et al.* 2003; Martí *et al.* 2011). Por todo ello, la función de los sistemas antioxidantes es la de prevenir o compensar el daño generado por estas ROS intentando mantener un equilibrio oxidativo en las células del fruto.

El H₂O₂ es una de las ROS producidas durante el metabolismo celular. Se sabe que esta ROS a bajas concentraciones actúa como molécula señal en procesos como el ciclo celular, crecimiento y desarrollo de la planta, funciones fotosintéticas o en respuestas frente a estreses abióticos y bióticos (Sofa *et al.* 2015). Sin embargo, los desequilibrios en los niveles de esta molécula dan lugar a daños oxidativos, tanto dentro como fuera de los peroxisomas donde la capacidad de descomposición de esta molécula está saturada (del Río *et al.* 2006; Hu *et al.* 2012) afectando de esa manera a la función de otros orgánulos celulares.

La catalasa y las peroxidases son enzimas claves en la eliminación del peróxido de hidrógeno cuando esta especie se produce en exceso, o en la regulación de los niveles del mismo cuando el H_2O_2 actúa como señal molecular que se usa para transmitir información entre células y tejidos.

La catalasa es una hemoproteína tetramérica cuya principal función es la de eliminar H_2O_2 y transformarlo en H_2O y O_2 , jugando un papel fundamental no sólo en el metabolismo y defensa de la planta sino también en la percepción de señales (Scandalios *et al.* 1997; Hu *et al.* 2010; Mhamdi *et al.* 2010; Liu *et al.* 2015; Nie *et al.* 2015; Anjum *et al.* 2016). Esta enzima se localiza en peroxisomas, siendo utilizada como marcador de estos orgánulos (Heinze & Gerhardt 2002; del Río *et al.* 2006). En plantas superiores, ha sido descrita en peroxisomas de hojas, de cotiledones, de raíces, glioxisomas y peroxisomas no especializados (Su *et al.* 2014). Diferentes trabajos han sugerido que esta enzima también podría encontrarse en mitocondrias (Scandalios 1990; Heazlewood *et al.* 2004; Shugaev *et al.* 2011), aunque los datos presentados a este respecto no eran totalmente concluyentes.

Las catalasas vegetales presentan similitudes entre número de subunidades, tamaño molecular y tipos de grupo protético. Esta enzima suele presentar 4 subunidades de un tamaño comprendido entre 55 y 59 kDa y cuya estructura cuaternaria oscila entre 220 y 240 kDa (Corpas *et al.* 1999; Heinze & Gerhardt 2002; Palma *et al.* 2013). Los polipéptidos de la catalasa están codificados en el núcleo y son dirigidos de manera post-traducciona l a los peroxisomas (Purdue & Lazarow 2001; Baker & Graham 2013).

En plantas, la catalasa está codificada por una familia de genes, lo cual indica la complejidad funcional que tiene esta enzima durante el desarrollo y en respuesta a distintos estreses (Corpas *et al.* 2017). Como se ha mencionado anteriormente, el principal papel de la catalasa es la eliminación del H_2O_2 que es generado en los peroxisomas como consecuencia de su propio metabolismo o del peróxido de hidrógeno que se acumula en ellos, derivados de otros orgánulos (Halliwell 2007). La reacción catalizada por la catalasa es muy rápida aunque presenta baja especificidad con su sustrato en comparación con otras peroxidases como la ascorbato peroxidasa. Pero debido a su abundancia celular, es uno de los principales mecanismos de eliminación de H_2O_2 frente a situaciones de estrés asociadas a un aumento de ROS (Palma *et al.* 2013).

La presencia de un grupo hemo en esta enzima hace que esta metaloenzima sea inhibida por cianuro, ázida o hidroxilamida. Por otro lado, la inhibición causada por mercaptoetanol y aminotriazol indica la presencia de grupos tiol. Estudios relacionados con la temperatura óptima de reacción para esta enzima indican una amplia variabilidad entre especies que oscila desde los 30-35° C en *Oryza sativa* y *Anethum graveolens* (Mitsuda & Yasumatsu 1955; Arabaci 2011), pasando por 15°C en hojas de espinaca, hasta los 50°C, encontrada en algunas variedades de manzana (*Golden delicious*). Esta variabilidad podría estar asociada a las temperaturas óptimas de desarrollo de cada planta (Anjum *et al.* 2016).

El número y expresión de las diferentes isoenzimas de catalasa cambia durante el desarrollo de la plantas y bajo diferentes condiciones ambientales (Corpas 2015), siendo reguladas temporal y espacialmente (Skadsen *et al.* 1995; Willekens *et al.* 1997).

La catalasa ha sido objeto de estudio desde varios puntos de vista y en todo tipo de especies, principalmente debido a su importancia fisiológica y su papel en el mantenimiento de los niveles de H₂O₂ tanto en condiciones celulares normales como en situaciones de estrés. Por ello, se han estudiado las características y la modulación de esta enzima frente a estreses tanto bióticos como abióticos, como la sequía y la salinidad (Sofa *et al.* 2015), contaminación por metales pesados (Malecka *et al.* 2001; Sandalio *et al.* 2001; León *et al.* 2002; Romero-Puertas *et al.* 2002; Leterrier *et al.* 2012) o la defensa frente a patógenos. Sin embargo, también se ha estudiado su modulación en diferentes etapas del desarrollo, como la senescencia o la maduración; así se ha comprobado como esa enzima en frutos de pimiento se ve regulada durante el proceso de maduración, observándose un descenso en su actividad en frutos maduros (Mateos *et al.* 2003). Estudios recientes en nuestro grupo han demostrado cómo esta enzima está sujeta a modificaciones post-traduccionales como la nitración durante la etapa de maduración, que pueden verse revertidos al someter a los frutos de pimiento a incubaciones en atmósferas enriquecidas con NO (Chaki *et al.* 2015). Sin embargo, todavía no se tienen datos suficientes sobre las propiedades moleculares de la catalasa de frutos de pimiento ni de cómo se modula o cómo se afecta la actividad catalasa durante periodos de almacenamiento prolongados, por lo que son necesarios análisis que ayuden a dilucidar tales propiedades.

Las peroxidasas (PODs) (EC; 1.11.1.7), al igual que la catalasa emplean peróxido de hidrógeno como sustrato aunque su función también está asociada a la oxidación de compuestos de difícil metabolización y que, tras ser oxidados, pueden ser útiles para el organismo. Estas enzimas son glicoproteínas que se encuentran distribuidas en la mayoría de las plantas. Presentan diferentes formas isoenzimáticas con diferentes masas moleculares, puntos isoeléctricos, pH y temperatura óptima, especificidad del sustrato y estabilidad térmica (Saraiva *et al.* 2010).

Generalmente las plantas poseen dos tipos de hemoperoxidasas; las peroxidasas de clase I que son intracelulares, y las peroxidasas de clase III que son secretadas en la pared celular o en la vacuola. Las peroxidasas de clase III catalizan la reducción de H_2O_2 usando electrones cedidos de diferentes moléculas. Están involucradas en diferentes funciones fisiológicas como la formación de la pared celular, defensa frente a estreses bióticos y abióticos, catabolismo de las auxinas y biosíntesis de metabolitos secundarios (De Gara 2004; Mittler *et al.* 2004; Cheeseman 2007; Cosio & Dunand 2009; Csiszár *et al.* 2012). En trabajos como el de De Gara (2004) se muestra cómo los niveles de otros antioxidantes celulares como el ascorbato pueden afectar a las reacciones llevadas a cabo por las PODs, y se observa cómo ambos antioxidantes están involucrados en procesos fisiológicos como la eliminación de ROS durante la fotosíntesis, elongación celular e incluso en mecanismos de muerte celular programada (PCD).

Las peroxidasas pertenecen a una larga familia multigénica. Por ejemplo en *Arabidopsis thaliana* se encuentran 73 miembros, en *Eucalyptus grandis* 181 y en *Oryza sativa* 138 (Fawal *et al.* 2013). Son consideradas enzimas bifuncionales ya que oxidan diferentes sustratos en presencia de H_2O_2 pero también son capaces de producir ROS (Passardi *et al.* 2004). Una de las características de las peroxidasas es que están asociadas con procesos de elongación celular, pero a su vez también están involucradas en reacciones que restringen el crecimiento. Durante el crecimiento de la planta, la expansión celular está asociada a procesos de rigidez y ablandamiento de la pared celular (Francoz *et al.* 2015). El balance entre esos dos procesos puede ser regulado por la actividad de peroxidasas del tipo III (CIII Prxs) (Fig. 1.1).

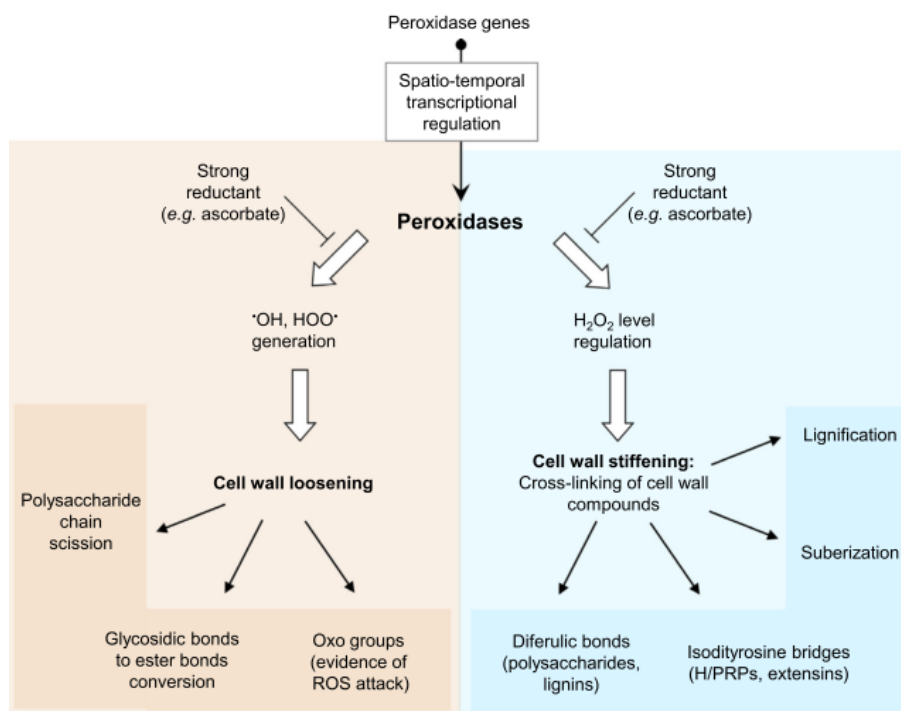


Figure 1.1. Activity of peroxidases. CIII Prxs are capable of generating ROS such as $\cdot\text{OH}$ and $\text{HOO}\cdot$, but they can also regulate the levels of H_2O_2 . Therefore, they play an important role in cellular growth by controlling the balance between cell wall loosening and the novo cell wall synthesis. H/PRPs: Hydroxyproline/Proline-Rich Proteins. Model from Francoz *et al.* (2015).

En este trabajo se ha llevado a cabo un análisis bioquímico y molecular de enzimas que metabolizan el peróxido de hidrógeno como la catalasa y peroxidasas en los frutos de pimiento. Se han estudiado parámetros de estrés oxidativo como la peroxidación lipídica y se cuantificaron los niveles de clorofilas y carotenos. Para ello se utilizaron extractos crudos de fruto de pimiento verde y rojo. Para algunos de los análisis realizados se trabajó con extractos de pimiento tratados en una atmósfera enriquecida con NO y posteriormente sometidos a diferentes condiciones de almacenamiento.

1.2. RESULTADOS/ RESULTS

Antes de proceder al estudio de catalasa y peroxidasas durante la maduración de los frutos de pimiento, se realizaron algunos ensayos para conocer el estado fisiológico de los mismos. En concreto, empleando el cultivar Vergasa, que es del tipo de pimiento California que vira a rojo en la maduración, se analizaron los pigmentos fotosintéticos

clorofila y carotenoides, así como los niveles de peroxidación lipídica en los diferentes estadios de maduración.

1.2.1. Clorofilas y carotenoides

La determinación de las clorofilas y carotenoides totales se llevó a cabo en pimientos verdes, envero y rojos. Los resultados muestran cómo durante el proceso de maduración existen cambios significativos a nivel de clorofilas, observándose los mayores niveles en el pimiento verde y una reducción considerable en frutos envero, hasta casi hacerse inapreciable en los frutos rojos (Figura 1.2.a). Sin embargo, el comportamiento de los carotenoides es el opuesto, pues a medida que el pimiento se encuentra en su estado más maduro (rojo) el nivel de carotenoides aumenta significativamente tal y como se muestra en la gráfica (Fig. 1.2a). El espectro de absorbancia de extractos de pimientos mostró un patrón típico de tejidos vegetales verdes en los frutos verdes, con picos de absorción en la zona de los 430-470 nm, propia de carotenoides, y otro máximo alrededor de 670 nm, correspondiente a las clorofilas (Fig. 1.2b). Dicho pico estaba ausente en los frutos rojos, que sí mostraban máximos en las zonas más bajas del espectro, característico de tejidos vegetales rojos o naranjas.

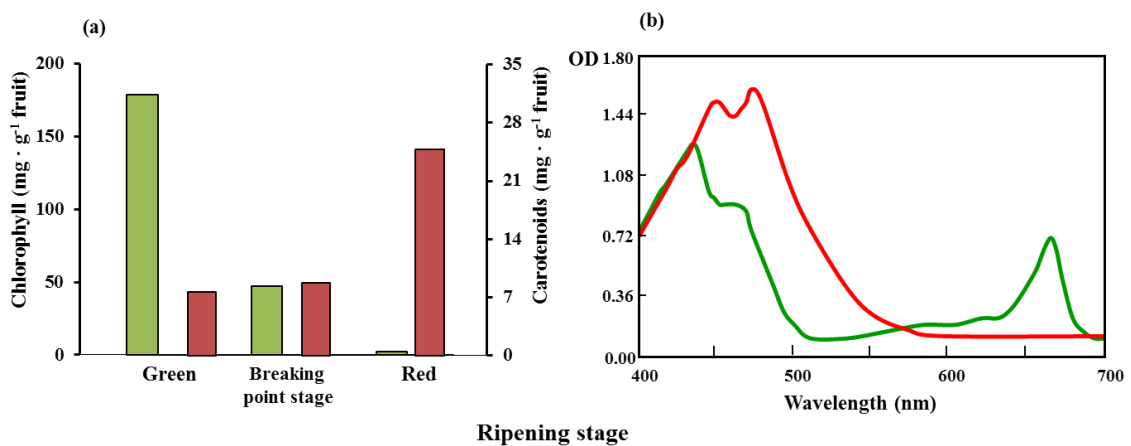


Figure 1.2. (a) Contents of total chlorophylls (green colour) and carotenoids (red colour) in pepper fruits at three different ripening stages. (b) Absorption spectra of pepper fruits. Line green corresponds to green fruits and line red to red fruits.

1.2.2. Peroxidación lipídica

Una de las características de estados avanzados del desarrollo y la maduración de frutos es el aumento en los niveles de peróxidos lipídicos, consecuencia de los desequilibrios oxidativos que ocurren en el metabolismo. Para comprobar de manera rápida y sencilla el estado oxidativo de los frutos durante la maduración, se analizó la peroxidación lipídica en extractos de pimiento verde y rojo. Tal y como se observa, la peroxidación lipídica aumentó en pimientos rojos respecto a los pimientos verdes, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos pimientos ($p < 0,05$) (Fig. 1.3).

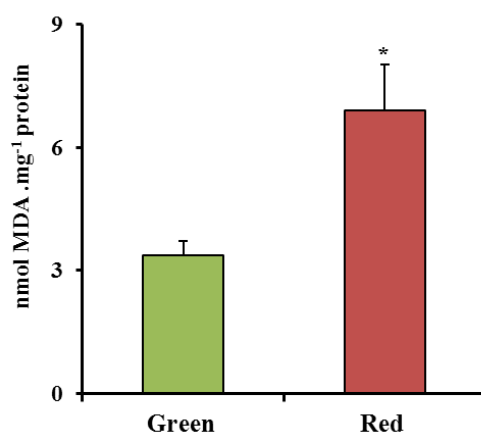


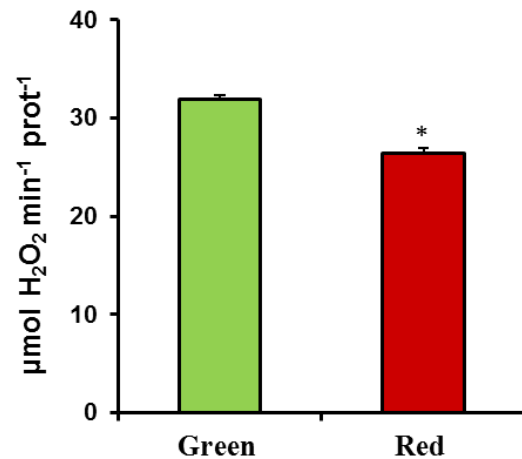
Figure 1.3. Lipid peroxidation of pepper fruits at two ripening stages (Green and Red). Lipid peroxidation was measured as nmol MDA per mg protein. Data are means \pm SEM of at least three different independent experiments. * Differences between values were significant at $p < 0.05$ according to *t*-Student test.

1.2.3. Catalasa de frutos de pimiento

❖ Actividad total e isoenzimática

La actividad específica de la catalasa fue medida en frutos tipo California verde y rojo de la variedad Vergasa. Tal y como se observa en la Figura 1.4, la actividad catalasa sufre un ligero descenso de un 24% a lo largo de la maduración, con diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos estadios analizados.

Figure 1.4. Catalase activity in pepper fruits at two ripening stages (Green and Red). Results are means \pm SEM of samples from at least three different experiments. Statistical analysis (*t*-Student test) indicated significant differences at $p < 0.05$.



El análisis de la actividad catalasa isoenzimática se llevó a cabo en geles nativos al 6% de acrilamida, tanto en frutos verdes como rojos. Dicho ensayo mostró la existencia de una única isoforma en ambos tipos de frutos, tal y como se aprecia en la Figura 1.5a. Al comparar ambas muestras de pimiento en los geles, se observó una mayor intensidad en la banda correspondiente a los frutos verdes en relación a la actividad detectada en rojos. Con el fin de corroborar dichos resultados, se llevó a cabo el análisis de las bandas de actividad con el analizador de imagen Image J. Dichos análisis muestran de nuevo una disminución de intensidad en el fruto de pimiento rojo frente al pimiento verde, siendo esta de aproximadamente un 20 %, dato similar al obtenido espectrofotométricamente.

En el análisis de la expresión proteica de la catalasa realizado por *western blot* mostró la misma tendencia (Fig. 1.5b). Este ensayo se llevó a cabo con geles de EGPA-SDS (4-20% de acrilamida) preparados de BioRad. Las incubaciones se realizaron con un anticuerpo específico frente a catalasa de *Arabidopsis* (Agrisera) a una dilución 1:5000. Tras el revelado por quimioluminiscencia se detectó una única banda inmunoreactiva de 55 kDa (Fig. 1.5b). La banda era más intensa en los frutos verdes y apenas detectable en los rojos, siguiendo por tanto el mismo comportamiento al observado cuando se determinó actividad catalasa.

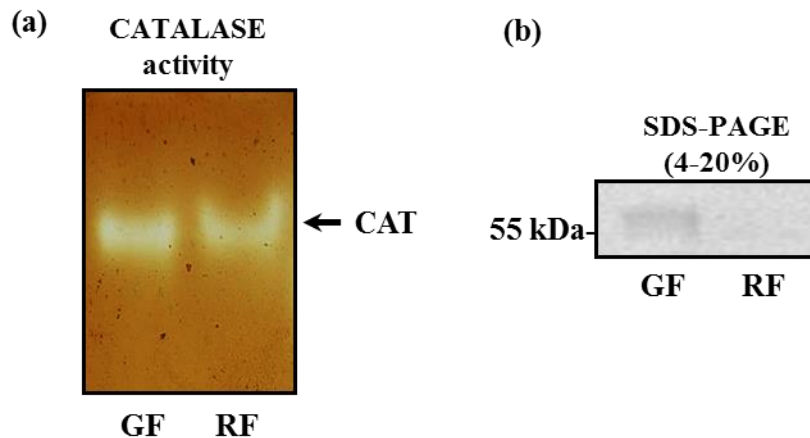


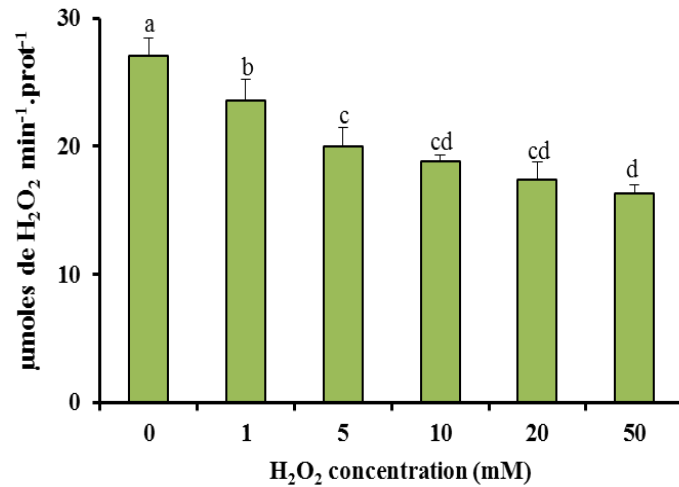
Figure 1.5. Isoenzymatic activity and protein expression of catalase in pepper fruits. (a) Catalase activity was detected in gels (6% acrylamide) after native EGPA and specific staining. (b) Western blotting using an antibody against catalase (1:5000 dilution). Proteins (30 μ g) were separated in precast gels (4-20%) and transferred onto a PVDF membrane. GF, green fruit; RF, red fruit.

❖ **Modulación de la actividad catalasa por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en frutos de pimiento**

Con objeto de investigar el efecto del H_2O_2 sobre la actividad catalasa en frutos de pimientos durante la maduración se llevaron a cabo diversos análisis *in vitro*. Para ello, se incubaron extractos frescos de frutos verdes con concentraciones crecientes de H_2O_2 (0-50 mM) durante 30 min a 25°C en oscuridad y agitación, y se analizó la actividad total de la enzima, así como su perfil isoenzimático por EGPA nativa y su expresión proteica por *western blot*.

La medida de la actividad enzimática total (Fig 1.6) mostró una disminución de la misma conforme aumentaba la concentración de H_2O_2 . Esta disminución se apreció de forma muy significativa (ANOVA, $p < 0,05$) a concentraciones elevadas (20-50 mM) donde la inhibición era casi del 40%. No obstante, se observó cómo ya a partir de concentraciones de 5 mM la actividad sufría una reducción que era significativa, tendiendo a estabilizarse a concentraciones superiores a ésta (Fig. 1.6).

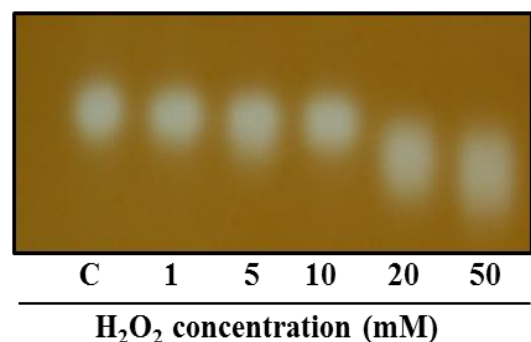
Figure 1.6. Modulation of catalase activity from pepper fruits by H₂O₂. Crude extracts from green peppers were incubated in the presence of 0-50 mM H₂O₂ for 30 min and then the activity was determined. Results are means ± SEM of samples from at least three different experiments. Columns with distinct letters were statistically different (ANOVA, p<0.05).



También se analizó la actividad catalasa mediante geles nativos al 6% de poliacrilamida donde se apreció una ligera disminución de la actividad catalasa a concentraciones altas de peróxido de hidrógeno (Fig.1.7), si bien lo más llamativo fue el cambio en la movilidad de la enzima que era mayor en los tratamientos a partir de 20 mM. Los resultados de la tinción de catalasa en geles se analizaron con el procesador de imágenes *Image J* (Fig. 1.7 b, d), con el que se confirmó una disminución del 21% para concentraciones de 20-50 mM de H₂O₂, si bien dicha disminución no era significativa en base al análisis de varianza aplicado en los resultados obtenidos.

Catalase Activity (GF)

Figure 1.7. Catalase activity in native gels of pepper samples subjected to different H₂O₂ concentrations. Specific catalase activity staining was achieved in 6% acrylamide gels after native PAGE. Pepper fruit samples (20 µg) were treated with H₂O₂ (0-50 mM) for 30 min, and then loaded onto gels.



❖ **Estabilidad de la catalasa de frutos de pimiento en función del tiempo**

Con el objetivo de determinar la estabilidad de la enzima a lo largo del tiempo en frutos de pimiento se realizaron varios ensayos *in vitro*. Se prepararon extractos de pimiento verde, siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos 4.1, a 4°C. Los extractos se incubaron a 4°C y durante el ensayo se tomaron alícuotas a distintos tiempos: 0, 3, 6, 24, 48 y 72 horas. Posteriormente las muestras se almacenaron a -80°C para su posterior análisis con el fin de evitar diferencias debido a la casuística de la manipulación de muestras y soluciones de sustratos entre medidas. Se siguió el siguiente diseño experimental (Fig. 1.8):

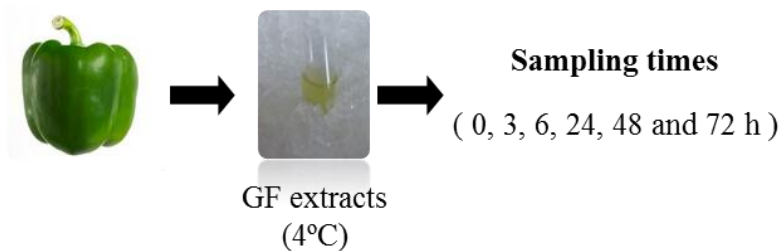
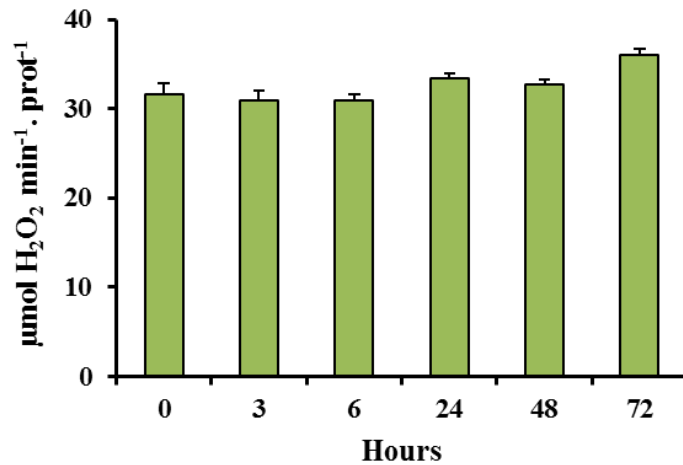


Figure 1.8. Experimental design for analysis of catalase activity in pepper fruits. Crude extracts from green pepper (GF, green fruits) were prepared. Afterward crude extracts were kept at 4°C, and then different aliquots were collected at different times (0, 3, 6, 24, 48 and 72 h). The all of them were preserved at -80°C, previous to analysis of enzyme activity.

Se analizó la actividad específica en frutos verdes a los tiempos indicados anteriormente. Como se observa en la Fig. 1.9, la actividad no sufrió cambios significativos a lo largo del tiempo según se determinó mediante la aplicación del análisis de varianza (ANOVA, $p > 0,05$).

Figure 1.9. Assay of catalase activity in pepper fruits as a function of time. Samples were incubated at 4°C for 0-72 h and then analysed for catalase activity. Results are means \pm SEM of samples from at least three different experiments.



La actividad catalasa se analizó también en geles nativos al 6 % de poliacrilamida en las muestras de pimiento verde, incubadas a 4°C durante 0-72 h y se realizaron los *western blot* correspondientes empleando el anticuerpo referido anteriormente (Fig. 1.10). Se observó que tanto en los geles de actividad como en los de transferencia de western la actividad y expresión proteica de la catalasa no sufrían cambios significativos con el tiempo. Estos resultados mostraban un paralelismo con los obtenidos anteriormente en los ensayos espectrofotométricos.

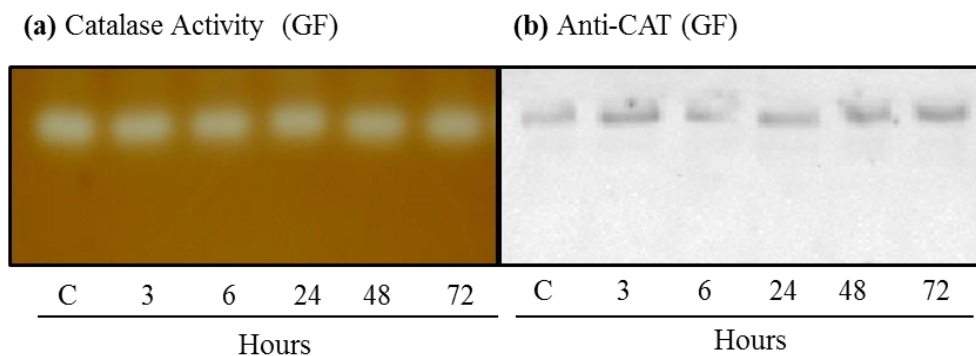


Figure 1.10. Assay of catalase isoenzymatic activity and protein expression as a function of time in pepper fruit. Previous to electrophoresis, samples were incubated at 4°C for 0-72 h as indicated in the text. Native electrophoresis in 6% acrylamide gels was performed for these assays. **a)** Gel of green pepper fruit samples (20 µg protein) stained for catalase activity. **(b)** Western blot of pepper fruit samples (20 µg protein) probed with an antibody against catalase (1:5000 dilution).

❖ **Modulación de la actividad catalasa en frutos de pimiento en presencia de donadores de NO y agentes reductores.**

Para profundizar en la regulación post-traducciona de la catalasa de fruto de pimiento, se llevaron a cabo análisis *in-vitro* de la actividad de la enzima en presencia de compuestos que, por su naturaleza moduladora, podrían actuar sobre la actividad de la misma. Para ello, se emplearon extractos de pimiento verde, que fueron incubados con diferentes donadores de NO como el nitrosoglutatión (GSNO) y el DeaNONOato, un donador de peroxinitrito como el SIN-1, y agentes reductores, como el DTT y el glutatión reducido (GSH). Se realizaron incubaciones de 45 minutos a 25 °C en oscuridad y con agitación, a las siguientes concentraciones: SIN-1, 2 mM; GSNO, 2 mM; DeaNONOato, 2 mM; GSH, 2 mM; y DTT, 5 mM.

La figura 1.11 muestra la inhibición de la actividad catalasa por los diferentes moduladores empleados. Se destaca el efecto ejercido por los donadores de especies de nitrógeno reactivo (RNS), tanto de óxido nítrico (GSNO y DeaNONOato), que provocaron una disminución de la actividad del 27,5% y 71,5%, respectivamente, como del SIN-1, que genera una disminución del 45,2%. En todos los casos, tanto de donadores de RNS como de reductores, la actividad catalasa disminuía de una forma estadísticamente significativa (*t*-Student, $p < 0,05$).

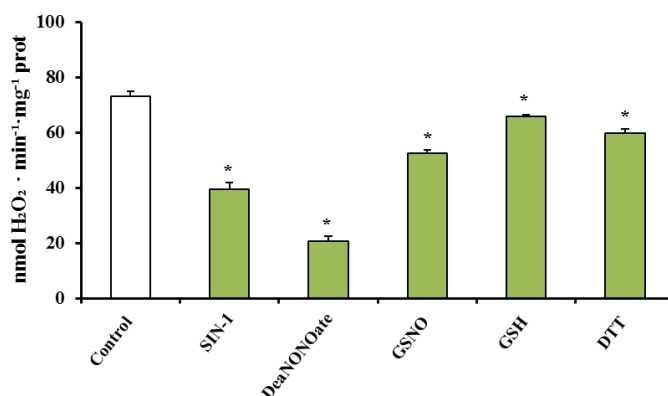
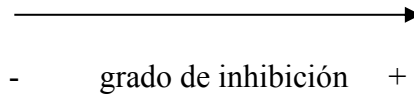


Figure 1.11. Effect of different modulating agents on catalase activity from pepper fruits. Crude extracts from green fruits were incubated for 45 min in the absence/presence of 2 mM SIN-1, 2 mM GSNO, 2 mM DeaNONOate, 2 mM GSH, and 5 mM DTT, and then catalase activity was determined. Asterisks (*) denote significant differences of treatments with respect to control conditions in the absence of agents (Student *t*-test, $p < 0,05$).

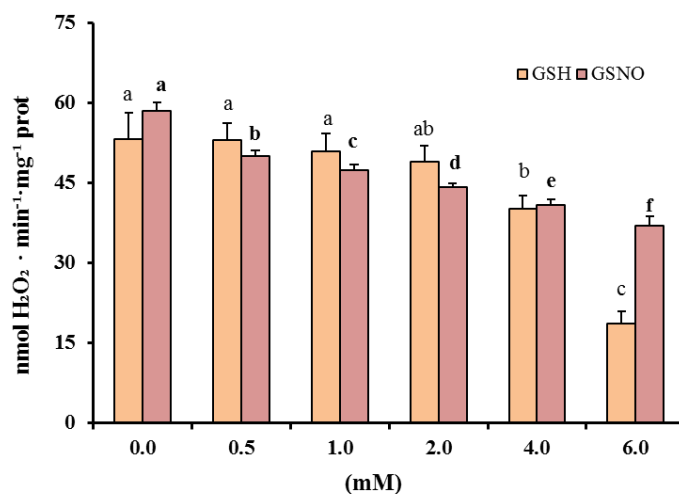
Con los resultados obtenidos se estableció un ranking del grado de inhibición de la actividad que, expresándolo de menor a mayor, quedaría según se indica a continuación:

GSH < DTT < GSNO < SIN-1 < DeaNONOato.



Dado el significado fisiológico del GSH y del GSNO en células vegetales, se llevó a cabo un estudio empleando un gradiente de concentraciones de ambos compuestos con el fin de conocer mejor el rango de inhibición sobre la actividad catalasa. Los resultados de los ensayos *in vitro* realizados sobre extractos de pimiento verde con concentraciones crecientes de GSH y GSNO mostraron cómo la actividad catalasa disminuía a medida que se incrementaba la concentraciones de ambos agentes (Fig. 1.12). En los ensayos realizados con GSH se apreciaba cómo, a las concentraciones más bajas, la actividad no sufría cambios significativos, o aquellos que se producían no eran relevantes; sin embargo cuando se incrementaban estas concentraciones (4-6 mM) la actividad se veía fuertemente afectada mostrando una diferencia significativa ($p < 0,05$), con un descenso de casi un 30% para la concentración 4 mM y de un 60% para GSH 6 mM, con respecto al control (0 mM).

Figure 1.12. Effect of reduced glutathione (GSH) and nitrosoglutathione (GSNO) on the catalase activity from green pepper fruits. Crude extracts of green pepper were treated with different GSNO and GSH concentrations (0-6 mM) for 45 min (25°C, darkness). Afterwards the activity was determined spectrophotometrically. Statistic analysis was performed in green and red fruits independently. Columns with distinct letters above (plain in green fruits and bold in red fruits) were statistically different (ANOVA, $p > 0.05$).



Por otro lado, los ensayos realizados con GSNO mostraban un descenso significativo de la actividad para todas las concentraciones, siendo el más acusado el producido a concentraciones altas de 4-6 mM, donde se producía un descenso de la actividad de aproximadamente un 30 y un 40 %, respectivamente con respecto a las condiciones control (0,0 mM); en estos ensayos todas las diferencias fueron significativas respecto al control ($p < 0,05$) según el análisis de varianza (ANOVA).

❖ **Caracterización molecular de la catalasa de frutos de pimiento**

Se determinó el tamaño molecular nativo de la enzima en frutos de pimiento verdes y rojos del tipo California, siguiendo el método de Hedrick and Smith (1968). Se realizaron diversas electroforesis en condiciones nativas y empleando diferentes concentraciones de poliacrilamida (5, 6, y 7%) (Fig. 1.13). Una vez transcurrida la electroforesis, se tiñeron los geles para la actividad catalasa, según se indicó anteriormente, y se analizó la movilidad de las bandas (R_f) en las muestras de pimiento para cada una de las concentraciones de acrilamida. Esta movilidad se comparó con la de proteínas patrón de masa molecular conocida, cuyos geles en las distintas concentraciones de acrilamida se tiñeron con azul Coomassie, según el protocolo descrito en el apartado de Material y métodos.

Se determinó el R_f de cada una de las proteínas detectadas en los geles de acrilamida, tanto de las bandas de actividad catalasa como de los patrones teñidos con azul Coomassie, según la fórmula:

$$R_f: \frac{\text{distancia de migración de la proteína}}{\text{distancia de migración del frente electroforetico}}$$

Se representaron los valores correspondientes al algoritmo $100 \times \log (R_f \times 100)$ frente a los porcentajes de acrilamida de los geles (Fig. 1.14a; Gráfica A). Posteriormente, se realizó una gráfica final en la cual se representaron en el eje de ordenadas las pendientes obtenidas anteriormente frente a los tamaños moleculares conocidos de las proteínas estándar, que en nuestro caso fueron las distintas formas oligoméricas de la albumina de suero bovino (monómero, dímero, trímero y tetramero) (Fig. 1.14b; Gráfica B).

En la gráfica obtenida se interpoló la pendiente calculada para la catalasa de pimiento en la Gráfica A, de manera que se estimó que el tamaño molecular de dicha proteína era de alrededor de 135 kDa, tanto en los frutos verdes como en los rojos (Fig. 1.14b).

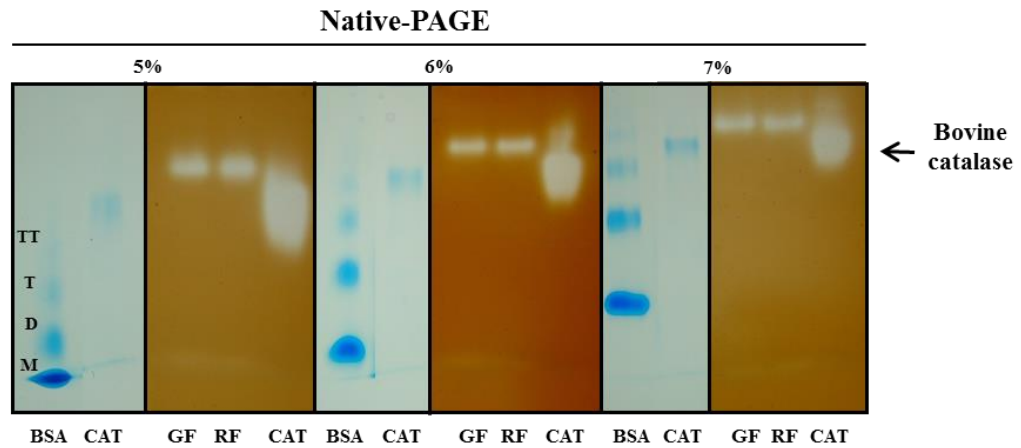


Figure 1.13. Non-denaturing electrophoresis of pepper catalase at different acrylamide concentration. For each acrylamide concentration, Coomassie stain of standards proteins (left) and catalase activity (right) are displayed; BSA, Bovine serum albumin TT, Tetramere; T, Trimer; D, Dimer; M, Monomer; CAT, commercial catalase from bovine liver; GF, green fruit; RF, red fruit.

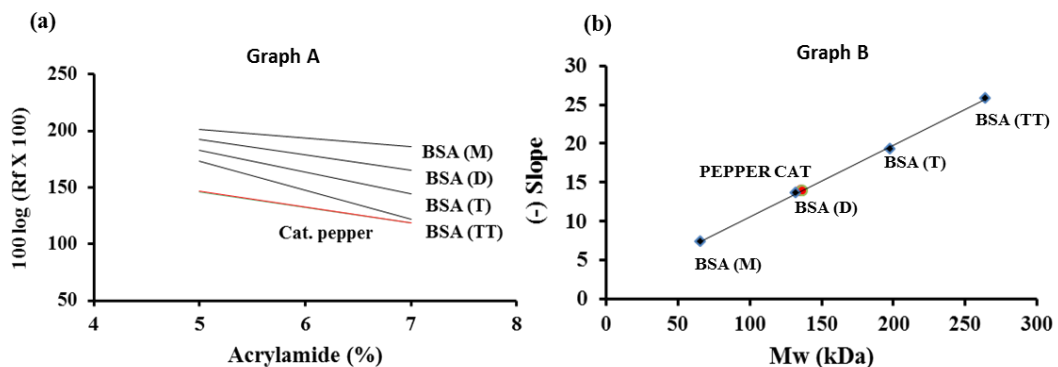


Figure 1.14 Estimation of the native molecular weight of catalase from pepper fruits by the Hedrick and Smith method. (a) Graph A, Slopes obtained of pepper catalase and oligomeric BSA molecular forms at different acrylamide concentrations (5-7%) after native PAGE. (b) Graph B, Molecular weight of Green and Red pepper catalase according to Hedrick and Smith method.

Teniendo en cuenta que éste sería un tamaño anómalo para una catalasa, según lo descrito en la bibliografía, pues esta proteína suele ser tetramérica con 220-240 kDa (Palma *et al.* 2013), se siguió un método alternativo para la determinación de la masa molecular nativa de la proteína de pimiento. Se empleó la técnica cromatográfica de filtración molecular mediante un equipo de FPLC y utilizando proteínas patrón de masa molecular conocida. En la Figura 1.15 se muestra el perfil de elución de extractos de frutos de pimiento concentrados a través de una columna Superose 12. En las fracciones recogidas se midió la absorbancia a 280 nm para conocer la distribución de las proteínas a lo largo de la cromatografía (Fig. 1.15a), y la actividad catalasa (Fig. 1.15b). La determinación de la actividad de esta enzima mostró un máximo a los 12-13 mL de elución correspondientes, fundamentalmente, a las fracciones 24-25. Asimismo, se analizaron las fracciones eluidas de la cromatografía por EGPA-SDS y el patrón de polipéptidos se muestra en la Fig. 1.15c. De igual manera, se llevó a cabo una transferencia de western en las fracciones 21-27, empleándose el anticuerpo frente a catalasa. Como se aprecia en la Figura 1.15d, el anticuerpo reconocía a una banda de unos 55 kDa sólo en las fracciones 24-25.

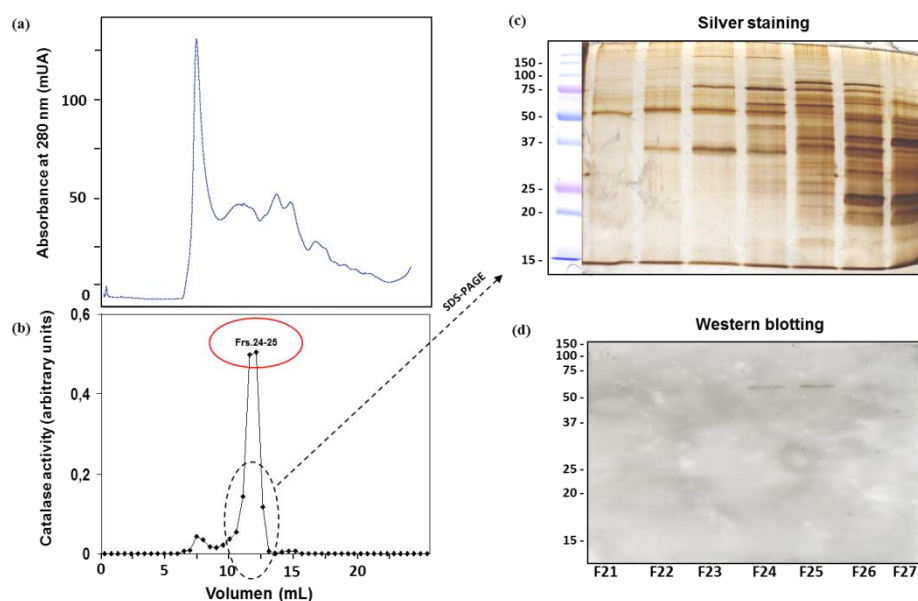
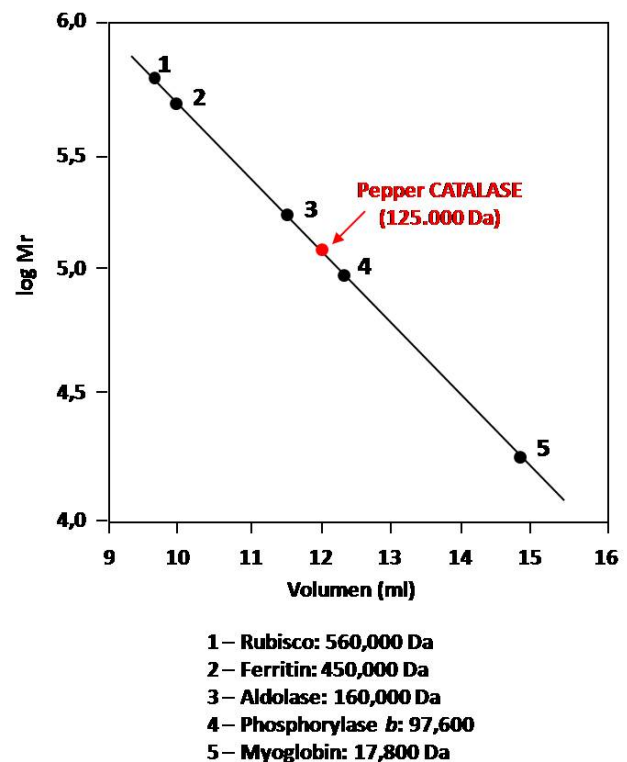


Figure 1.15. Gel filtration and electrophoretic analysis of concentrated crude extracts from pepper fruits. Green fruits were concentrated with ammonium sulphate (see Materials and methods) and then eluted through a Superose 12 column using an FPLC system. In the eluted fractions, the absorbance at 280 nm was measured (a), as well as the catalase activity (b). Eluted fractions F21-F27 were separated by SDS-PAGE (20 μ L/well) and gel stained with silver nitrate (c). Fractions F21-F27 were also analyzed by Western blotting using an antibody against catalase (dilution 1:1000). In electrophoresis and western blotting images, molecular weight markers are indicated on the left.

Se empleó el perfil cromatográfico de la catalasa de frutos de pimiento para determinar la masa molecular nativa de la enzima. Así, la columna de Superose 12 se calibró con una serie de proteínas comerciales de peso molecular conocido (Rubisco, ferritina, aldolasa, fosforilasa *b* y mioglobina). Representando el logaritmo de la masa molecular nativa de cada uno de estos patrones frente a su volumen de elución se obtuvo una pendiente en la que, interpolando el volumen de elución de las fracciones en las que se detectó actividad catalasa, se obtuvo un valor medio de 125 kDa (Fig. 1.16).

Figure 1.16 Determination of the native molecular mass of catalase from pepper fruits by gel filtration chromatography. The analysis was performed with a Superose 12 column using an FPLC system and calibrated with the molecular mass standard proteins Rubisco, ferritin, aldolase, phosphorylase *b* and myoglobin.



Finalmente, se determinó el punto isoeléctrico de la enzima mediante la técnica del isoelectroenfoque (IEF) en geles verticales. El análisis realizado en extractos de pimiento verde por IEF seguido del análisis de actividad en geles nativos reveló la presencia de una sola isoforma (Fig. 1.17) con un punto isoeléctrico de 7,4, diferente al valor obtenido en la catalasa de hígado bovino.

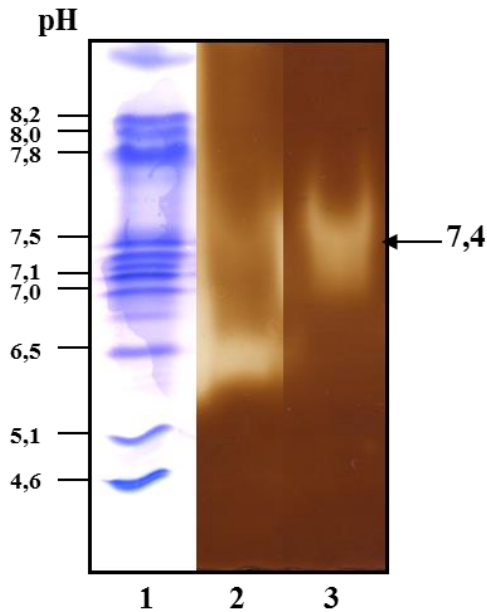


Figure 1.17. Determination of pI of catalase from pepper fruit by IEF. Lanes: 1, pI markers stained with Coomassie blue; 2, Catalase from bovine liver (Sigma); 3, catalase from green pepper fruits. Lanes 2 and 3 were stained for catalase activity with the DAB method.

1.2.4. Peroxidasas (POD)

❖ Guaiacol peroxidasa

En esta Tesis Doctoral se estudió también el comportamiento de las peroxidasas, enzimas relevantes en el metabolismo del H_2O_2 . En primer lugar se midió la actividad guaiacol peroxidasa tanto en frutos de pimiento verde como en frutos rojos (Fig. 1.18), observándose una mayor actividad en los frutos verdes, con diferencias significativas entre ellos de un 10% ($p < 0,05$)

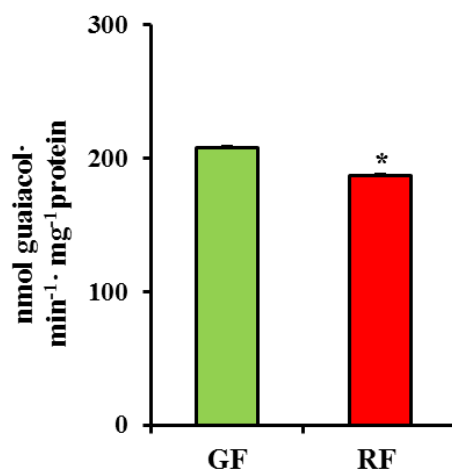


Figure 1.18. Guaiacol peroxidase in pepper fruits at two different ripening stages. GF, green fruit. RF, red fruit. Values are means \pm SEM of three different experiments.

❖ Actividad isoenzimática

El análisis isoenzimático de la actividad de peroxidasa mediante EGPA nativa en frutos verdes y rojos mostró la existencia de 3 isoenzimas, que se designaron POD I, POD II, POD III en base a su mayor movilidad electroforética (Fig. 1.19a). Se observó un cambio de intensidad en todas las bandas al comparar ambos tipos de pimientos. Mientras que en la banda correspondiente a POD I se observó una disminución de intensidad en el fruto rojo respecto al verde, en POD II y POD III el efecto fue al contrario, detectándose un aumento de intensidad significativo de ambas bandas en frutos rojos con respecto a los frutos verdes (Fig. 1.19a). El análisis densitométrico mediante el procesador de imagen Image J corroboró la tendencia que se observaba en los geles (Fig. 1.19b).

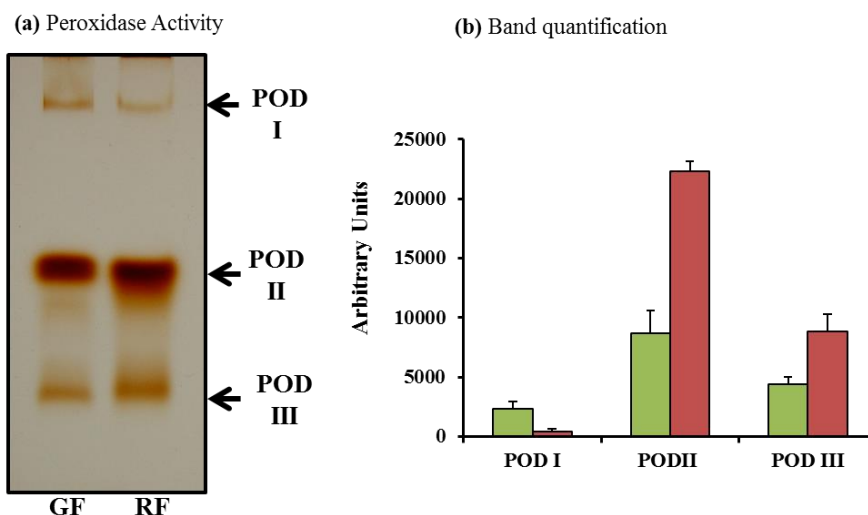


Figure 1.19. Peroxidase isozymes in pepper fruits after non-denaturing PAGE (a) Peroxidase activity staining. Samples (20 μ g of protein) were subjected to electrophoresis on native gels (8%). Peroxidase isoenzymes obtained POD I, POD II, POD III are labelled on the right. **(b)** Quantification of peroxidase bands stained in gels (1.19a) by the analyser ImageJ. GF, green fruits; RF, red fruits.

❖ Efecto del NO exógeno sobre la actividad peroxidasa

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se comprobó que la catalasa de pimiento era susceptible de sufrir nitración durante la maduración de los frutos, y que dicho comportamiento podría ser modulado por el tratamiento de los mismos con NO

(Chaki *et al.* 2015). Continuando con dicha investigación, y con el fin de determinar el papel del NO aplicado de forma exógena en el comportamiento de diferentes antioxidantes, se llevó a cabo la incubación de los frutos con 5 ppm de NO durante 1 hora y, posteriormente, se almacenaron durante 1-2 semanas a 6°C o a temperatura ambiente. En la Figura 1.20 se muestra el diseño experimental que se aplicó para este estudio y que estaba basado en el descrito por Chaki y colaboradores (2015).

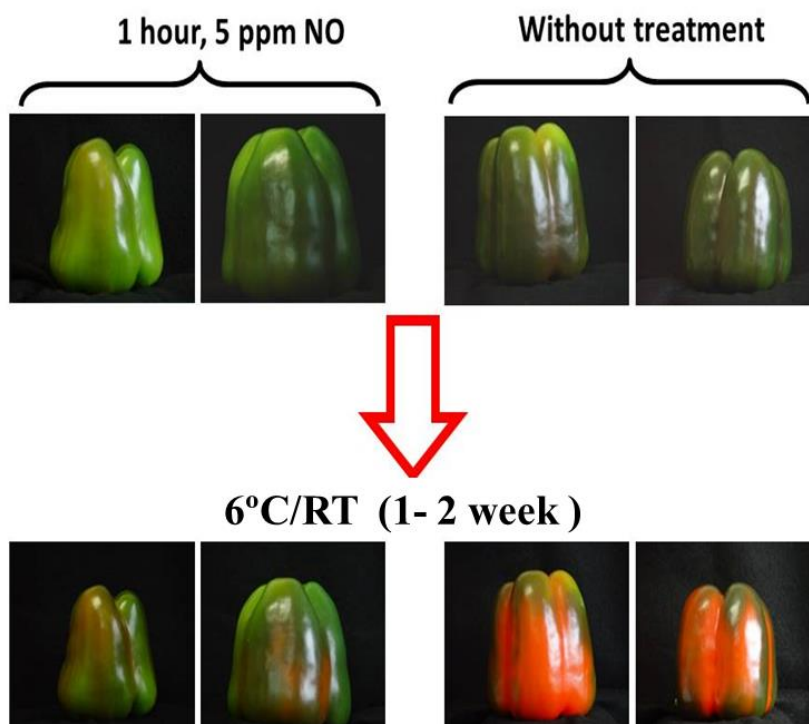


Figure 1.20. Effect of exogenous NO gas on the ripening of pepper fruits. NO (5 ppm) was either applied or not to fruits at a breaking point stage for 1 h. Then, peppers were incubated at either room temperature or 6°C for 1-2 weeks.

Se analizó la actividad peroxidasa en aquellos pimientos que habían sido tratados en una atmósfera enriquecida con NO y se observó cómo el patrón y la intensidad de las bandas variaba en función del tratamiento. Tal y como se observa en la Figura 1.21, la POD I sufría un aumento a la semana post-tratamiento, tanto en pimientos almacenados a 6°C como en los almacenados a temperatura ambiente; sin embargo, en la segunda semana, la POD I disminuía respecto al control en ambos casos. La POD II es la isoenzima que mostraba mayor actividad en todos los casos, viéndose afectada en la primera semana en aquellos pimientos que se mantuvieron a 6°C y en la segunda semana en los almacenados a RT, situaciones en las que se observó un ligero

descenso de esta actividad isoenzimática. Tanto en la segunda semana para los pimientos a 6°C como en la primera para los de RT la POD II aumentaba. La POD III presentaba prácticamente el mismo comportamiento que la POD II en las situaciones analizadas (Fig. 1.21).

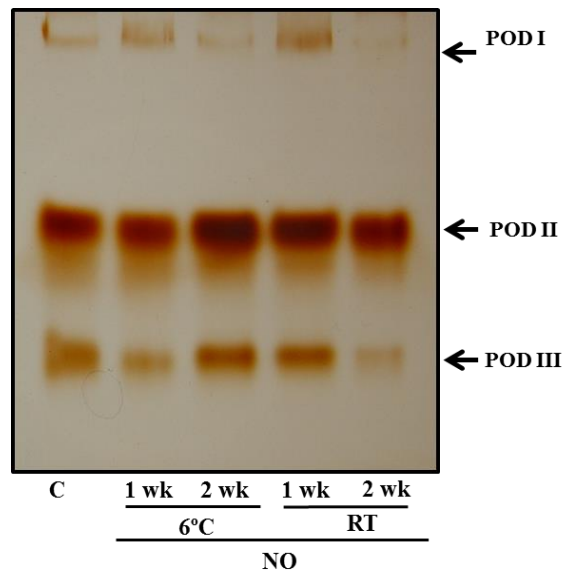


Figure 1.21 Peroxidase isozymes in pepper fruits treated with NO. Fruits were treated with 5 ppm NO for 1 h and then stored at 6°C or RT for 1-2 weeks. Proteins (20 µg per lane) were separated by native-PAGE (8%) and then stained for peroxidase activity. A representative out of three different experiments is shown. C, control; RT, room temperature.

1.3 DISCUSIÓN/ DISCUSSION

La maduración es la fase final del desarrollo del fruto, y supone profundos cambios metabólicos en la bioquímica, la fisiología y la expresión de genes del fruto, como la degradación de clorofila y la biosíntesis de pigmentos (carotenoides), entre otros (Howard *et al.* 2000; Palma *et al.* 2011a; Mateos *et al.* 2013; Palma *et al.* 2015). En los frutos de pimiento los pigmentos mayoritarios asociados a orgánulos como los cloroplastos (clorofilas) disminuyen o desaparecen, incrementándose la síntesis de los pigmentos propios de los cromoplastos (carotenoides). Por otro lado, se ha determinado cómo el nivel de síntesis de pigmentos como los carotenoides va asociado a cada variedad de pimiento (Mínguez-Mosquera & Hornero-Méndez 1994).

Los carotenoides no solo juegan un papel esencial a nivel celular como protectores frente al daño oxidativo, sino que presentan una gran importancia desde el punto de vista fisiológico (atravesados de polinizadores) y desde un punto de vista

antropológico en la nutrición y salud, ya que además de ser precursores de la vitamina A, protegen a las células ejerciendo de antioxidantes y por tanto ayudan a prevenir enfermedades degenerativas (Marín *et al.* 2004; Gómez-García & Ochoa-Alejo 2013). En este trabajo se corrobora la disminución global de las clorofilas frente al aumento de carotenoides durante la maduración de los frutos y su conversión de verdes en rojos. Dichos resultados presentaban la misma tendencia que los obtenidos en trabajos anteriores realizados en distintas variedades de frutos de pimiento durante el proceso de maduración (Mínguez-Mosquera & Hornero-Méndez 1994; Hornero-Méndez *et al.* 2000; Hornero-Méndez & Mínguez-Mosquera 2000; Marín *et al.* 2004; Gómez-García & Ochoa-Alejo 2013). En todos ellos se observó una disminución en el nivel de clorofilas hasta su práctica desaparición, acompañado de aumento de carotenoides.

Otro de los cambios que tiene lugar durante la maduración es el aumento de radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroperóxidos que conllevan a un incremento de la peroxidación lipídica (Martí *et al.* 2009) que va acompañado del deterioro en las membranas celulares. De hecho, los pimientos maduros presentan un tasa de peroxidación lipídica superior a la de los pimientos verdes tal y como se ha observado en este trabajo. El mismo comportamiento se ha descrito en trabajos realizados en melocotón (Huan *et al.* 2016), tomate (Jiménez *et al.* 2002) o en aguacate, donde se determinó que la peroxidación lipídica era uno de los primeros procesos tienen lugar durante la maduración (Meir *et al.* 1991). La peroxidación lipídica da lugar a moléculas que pueden reaccionar o dañar a proteínas o al ADN. Por ello este parámetro ha sido utilizado para evaluar la integridad de las membranas y como indicador de estrés oxidativo. Así, en un estudio genérico que agrupaba distintos tipos de estrés aplicados a cultivos celulares, se observó cómo el nivel de peroxidación lipídica se veía incrementado o modificado de forma significativa tras la aplicación de los respectivos estreses (Sharma *et al.* 2012). Procesos fisiológicos degenerativos como es la senescencia van asociados en plantas a un incremento de los productos de peroxidación lipídica como el malondialdehído (MDA) y a un desequilibrio entre la generación de especies de oxígeno reactivo y los sistemas antioxidantes (Kanazawa *et al.* 2000; Palma *et al.* 2006; Kumar *et al.* 2014; Corpas *et al.* 2017). Teniendo en cuenta que la maduración de los frutos puede ser considerado un proceso de senescencia que conlleva cambios importantes a nivel fisiológico y metabólico (Palma *et al.* 2011b), en este trabajo se ha pretendido analizar y caracterizar diferentes antioxidantes durante la

maduración del fruto de pimiento. En concreto, en este capítulo se hace un estudio de las enzimas que descomponen el H_2O_2 , catalasa y peroxidasa, analizando su función potencial durante la maduración de los frutos de pimiento y, en el caso de la catalasa, caracterizando la enzima, habida cuenta de su relevante papel en la fisiología del fruto, según se ha apuntado anteriormente (Chaki *et al.* 2015; Palma *et al.* 2015)

La catalasa es una de las principales proteínas peroxisomales relacionadas con la eliminación de peróxido de hidrógeno a nivel celular, tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés oxidativo, con el fin de evitar daños celulares y mantener las concentraciones de peróxido de hidrógeno en un nivel adecuado para el desarrollo y crecimiento normal de la planta (Palma *et al.* 2013; Anjum *et al.* 2016). A pesar de no presentar una fuerte afinidad por el H_2O_2 , al contrario que la ascorbato peroxidasa (APX), la catalasa actúa de forma eficiente a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. En trabajos realizados en nuestro laboratorio sobre el perfil de la catalasa en peroxisomas de frutos de pimiento verdes y rojos, se observó que la actividad era inferior en frutos maduros (Mateos *et al.* 2003), y que era una de las proteínas nitradas más abundantes durante la maduración. (Chaki *et al.* 2015; Álvarez de Morales 2016). Los datos mostrados en este capítulo ratifican estos resultados, mostrando cómo la actividad catalasa disminuía durante la maduración, evidenciando un menor contenido de esta enzima y por lo tanto una menor capacidad de eliminar H_2O_2 .

Mientras que en células animales existe sólo una isoforma de catalasa codificada por un solo gen, la catalasa de plantas suelen presentar múltiples isoformas codificadas por una pequeña familia de genes y por ello el número y expresión de las diferentes isoformas cambia durante el desarrollo de la planta y bajo diferentes condiciones ambientales (Corpas *et al.* 2017). Ejemplo de ello lo encontramos en cotiledones de plantas oleaginosas como el girasol (*Helianthus annuus*) donde aparecen 8 isoenzimas de catalasa durante la transición de glioxisomas a peroxisomas de hojas (Kunze & Trelease 1986; Eising *et al.* 1990), o en algodón donde aparecen 5 isoenzimas (*Gossypium hirsutum*) (Ni *et al.* 1990; Ni & Trelease 1991). Por otro lado, en *Arabidopsis thaliana* se han descrito al menos 6 isoformas codificadas por tres genes (CAT1, CAT2 y CAT3) (Corpas 2015). El análisis de peroxisomas de hojas de guisante mostró la existencia de cinco isoformas de catalasa diferenciadas en base a su distinta movilidad en geles de isoelectroenfoque (Corpas *et al.* 1999). Diferentes estudios sobre el perfil isoenzimático de la catalasa han mostrado cómo durante la maduración de

frutos como la ciruela india (*Ziziphus mauritiana* Lamk.) pueden inducirse nuevas isoformas de catalasa; de hecho, se observó cómo durante este proceso fisiológico se inducen hasta 2 isoformas en los citados frutos (Kumar *et al.* 2014). Nuestros resultados por EGPA nativa mostraron que en frutos de pimiento sólo se detecta una única isoenzima, tanto en frutos verdes como en rojos, siendo dichos resultados confirmados por el análisis isoenzimático mediante la técnica de isoelectroenfoque. Esta técnica aportó, además, que dicha isoenzima tiene un punto isoeléctrico de 7,4, superior al observado en otras catalasas vegetales (Mullen & Gifford 1993; Corpas *et al.* 1999).

Se ha descrito que el tamaño molecular nativo de la catalasa en plantas superiores oscila entre 220-240 kDa y que la proteína está formada por cuatro subunidades iguales cuya masa molecular media tiene alrededor de 55 kDa, aunque este valor puede variar en función del tipo de especie de 50-57 kDa (Mhamdi *et al.* 2012). En guisante (*Pisum sativum* L.), a partir de la enzima purificada de las hojas, se determinó un tamaño de 57 kDa para la subunidad (Corpas *et al.* 1999), que coincidía con el tamaño obtenido también en la aceituna (*Olea europea* L.) (López-Huertas & del Río 2014) donde se detectó una banda inmunoreactiva de 57 kDa en ensayos de transferencia de *western*. En los frutos de pimiento el tamaño detectado durante este trabajo fue de aproximadamente 55 kDa, coincidiendo con los valores descritos en trabajos anteriores realizados en este grupo (Chaki *et al.* 2015). No obstante, a lo largo de esta Tesis Doctoral y mediante el empleo de dos técnicas distintas, la de Hedrick y Smith basada en el comportamiento que tienen las proteínas en geles nativos con diferentes concentraciones de acrilamida, y la cromatografía por filtración molecular, se determinó que la catalasa de frutos de pimiento tenía un tamaño nativo anómalo, de entre 125.000-135.000 Da. Esto indicaría que, a diferencia del resto de catalasas tetraméricas, la de frutos de pimiento sería un dímero compuesto por dos subunidades idénticas de tamaño. No obstante, y dado lo atípico de este comportamiento, nuestros datos necesitan corroborarse por otros métodos alternativos.

Considerando el papel de la catalasa como defensa antioxidante y su posible papel en la percepción de señales celulares (Scandalios *et al.* 1997; Mhamdi *et al.* 2010), diferentes investigaciones han evaluado la estabilidad de esta enzima bajo diferentes situaciones *in vitro*. En presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (100 mM) se observó que la proteína sufría la oxidación en múltiples residuos de la cadena polipeptídica aunque su actividad no se veía afectada (Anand *et*

al. 2009). Por otro lado, se ha demostrado que donadores de NO como el GSNO, el DeaNONOato, donadores de peroxinitrito (ONOO^-), o agentes reductores como el DTT o el GSH pueden provocar la inhibición de la enzima (Sun & Oberley 1989; Clark *et al.* 2000; Ortega-Galisteo *et al.* 2012; Chaki *et al.* 2015). Esta inhibición podría tener implicaciones fisiológicas, debido a que la disminución de la actividad implica una menor capacidad de eliminar H_2O_2 y, en consecuencia, de producir un incremento del metabolismo nitro-oxidativo (Corpas & Barroso 2014). Este comportamiento ha sido descrito durante la senescencia de hojas y en la maduración de frutos de pimiento donde la actividad catalasa disminuye (Corpas *et al.* 2004; Chaki *et al.* 2015). Al disminuir la actividad, podrían incrementarse los niveles de H_2O_2 y dar lugar a una mayor peroxidación lipídica, efecto que se ha comprobado a lo largo de este trabajo.

Por otro lado, se ha demostrado cómo el H_2O_2 juega un papel importante como molécula señal provocando diferentes respuestas celulares dependiendo del sitio de producción y de su interacción con hormonas específicas (ácido abscísico, etileno u óxido nítrico). De hecho el peróxido de hidrógeno actúa como molécula señal en procesos de crecimiento, morfogénesis y desarrollo (Slesak *et al.* 2007; Sofo *et al.* 2015). Una de las características de esta molécula es su facilidad de difusión a través de las membranas celulares, lo que le permite ser transportada fácilmente, de manera que esta difusión a través de la membrana estaría regulada, entre otros factores, por los cambios en la composición de las propias membranas (Corpas 2015). En ensayos realizados con H_2O_2 aplicado en bajas concentraciones, se observó cómo se generaba una tolerancia al estrés debido a la inducción de ciertas sustancias similares a las sintetizadas bajo estrés por congelación (Matsuda *et al.* 1994). Sin embargo, en ensayos realizados con altas concentraciones de H_2O_2 se ha visto que la actividad de la enzima se veía inhibida (Switala & Loewen 2002). Los ensayos *in vitro* realizados para esta Tesis Doctoral muestran una disminución de la actividad enzimática a altas concentraciones de H_2O_2 , si bien nunca llegó a inhibirse más del 30%, aunque la enzima se incubó a concentraciones muy altas de peróxido de hidrógeno (50 mM). Esto, junto con el perfil de actividad mostrada por la enzima tras, al menos, tres días de incubación a 4°C, indica que la catalasa parece ser una enzima bastante estable, lo que confiere un valor añadido, y eso le permitirá actuar modulando los niveles de peróxido de hidrógeno en un proceso fisiológico tan relevante como es la maduración. Otra peculiaridad de la enzima del fruto de pimiento es que ésta mantiene unos niveles altos de actividad, a

pesar de la modificación que parece sufrir por acción del peróxido de hidrógeno, a tenor de lo observado en el cambio de su movilidad electroforética. Este fenómeno en el cambio en su movilidad electroforética podría ser debido a una oxidación de la proteína que provocaría una modificación de su punto isoeléctrico que sería el responsable del efecto observado.

Además de lo discutido acerca de la catalasa, la relevancia del metabolismo del H_2O_2 en la fisiología del fruto de pimiento también se corrobora por los cambios observados en el perfil de las peroxidasas (POD I-III). Las peroxidasas son enzimas que en plantas participan en diversos procesos metabólicos en los que es necesaria la oxidación de compuestos con el empleo de peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones (Csiszár *et al.* 2012). Durante la maduración de los frutos se llevan a cabo oxidaciones y tienen lugar cambios en los perfiles isoenzimáticos de estas enzimas. Por ejemplo en tomate (*Solanum lycopersicum* L) (Andrews *et al.* 2000; Ahn *et al.* 2002) o ciruela india (*Ziziphus mauritiana* Lamk.) (Kumar *et al.* 2014) las peroxidasas son inducidas durante la maduración. En nuestro caso se demuestra que, las peroxidasas podrían estar implicadas en la maduración de los frutos de pimiento. Asimismo, estas enzimas, al igual que ya se había observado anteriormente con la catalasa (Chaki *et al.* 2015), se ven afectadas por el tratamiento con NO, lo que redundaría en la participación de esta molécula señal en la maduración de los frutos a través del peróxido de hidrógeno.

CAPÍTULO 2

SUPERÓXIDO DISMUTASAS (SODs) DE PIMIENTO. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS. MODULACIÓN Y FUNCIÓN DE LA Fe-SOD.

CHAPTER 2

SUPEROXIDE DISMUTASES (SODs) FROM PEPPER. BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL STUDIES. MODULATION AND FUNCTION OF THE Fe-SOD

2.1. INTRODUCCIÓN/ INTRODUCTION

El objetivo perseguido en este capítulo ha sido el estudio de la modulación de las superóxido dismutasas (SODs) de frutos de pimiento, prestando especial atención a la caracterización bioquímica y molecular de la isoenzima que contiene hierro en su centro activo, la ferro-superóxido dismutasa (Fe-SOD). Para abordar este objetivo se han empleado diferentes variedades de pimiento, estudiando el perfil de las SODs durante el proceso de maduración, y se han hecho estudios comparativos con distintas especies vegetales.

Dentro de las enzimas más relevantes involucradas en el metabolismo de ROS y, consecuentemente, en el mecanismo de protección frente al estrés oxidativo, están las metaloproteínas. Entre las metaloenzimas más notables se encuentran las superóxido dismutasas (SOD; EC 1.15.1.1). Éstas son consideradas una de las principales barreras antioxidantes presentes en las células eucariotas, ya que actúan como primera línea de defensa contra los efectos tóxicos del radical superóxido producido en los diferentes compartimentos celulares (Halliwell & Gutteridge 1985; Fridovich 1986; Gutteridge & Halliwell 2000). La principal función de las SODs es la dismutación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (Fig. 2.1). El H_2O_2 es posteriormente transformado a H_2O por la catalasa o por otras peroxidasas, según se ha visto en el capítulo anterior.

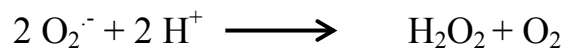


Figure 2.1. Dismutation of superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) by superoxide dismutase activity.

En células vegetales el anión superóxido se genera principalmente durante la fotosíntesis y la respiración mitocondrial derivado en ambos casos de las respectivas cadenas de transporte electrónico. Además, dicho radical puede ser generado de manera enzimática por diversas oxidasas, pudiendo actuar como molécula señal en respuesta a estrés o de intermediario en procesos de desarrollo y en el metabolismo celular general (Mittler *et al.* 2011). Independientemente de su origen y función, los niveles de $O_2^{\cdot-}$ son controlados por los sistemas antioxidantes, donde las SOD juegan un papel fundamental (Foyer & Noctor 2009).

Las SODs se clasifican principalmente en tres grupos en función del metal presente en el grupo prostético de la enzima: CuZn-, Fe- y Mn-SODs (Fridovich 1986; Rodríguez-Serrano *et al.* 2007; Palma *et al.* 2013). Excepcionalmente, también se ha descrito un grupo de SODs que contienen níquel (Ni-SOD) en el centro activo de la proteína y que tan solo se encuentra en organismos procariotas (Abreu & Cabelli 2010). En plantas superiores, el número y tipo de isoenzimas puede cambiar en función de la especie, etapa de desarrollo y condiciones ambientales (Alscher *et al.* 2002; Corpas *et al.* 2006; Begara-Morales *et al.* 2013; Signorelli *et al.* 2013). La sobreexpresión de las SODs se ha relacionado con la respuesta frente a estreses abióticos o bióticos a los cuales se ven sometidas las plantas (Gill & Tuteja 2010; Fernandez-Ocaña *et al.* 2011). En pimiento se ha comprobado que, junto con otros sistemas enzimáticos antioxidantes, las SODs están implicadas en la maduración de los frutos, así como en la respuesta de éstos frente a cambios ambientales por baja temperatura (Mateos *et al.* 2013).

Por otro lado, el nivel de transcritos de la SOD no siempre está correlacionado con la abundancia de la proteína o su actividad enzimática, sugiriendo que estas enzimas pueden estar controladas tanto por mecanismos post-transcripcionales como por post-traduccionales (Madamanchi *et al.* 1994; Kliebenstein *et al.* 1998). En este sentido publicaciones recientes sugieren que algunas modificaciones proteicas relacionadas con la regulación de las SODs en mamíferos y plantas podrían ser dependientes del óxido nítrico (Radi 2013b; Holzmeister *et al.* 2015).

Las CuZn-SODs son enzimas homodiméricas con una masa molecular nativa de alrededor de 32 kDa, constituida por dos subunidades idénticas. Estas metaloenzimas han sido localizadas en diferentes compartimientos celulares incluyendo los cloroplastos (tanto en el estroma como en los tilacoides), el citosol, el núcleo, el apoplasto y los peroxisomas (Salin 1988; Ogawa *et al.* 1995; Sandalio *et al.* 1997; Corpas *et al.* 1998; Pilon *et al.* 2011; Zafra *et al.* 2012; Palma *et al.* 2013). Las Mn-SODs pueden localizarse en mitocondrias y peroxisomas (del Río *et al.* 1983; Palma *et al.* 1998; del Río *et al.* 2003), y las Fe-SODs han sido encontradas principalmente en cloroplastos (Bowler *et al.* 1994), aunque también ha sido detectadas en peroxisomas (Droillard & Paulin 1990; Álvarez de Morales 2016). Estas dos últimas isoenzimas tienen un alto grado de similitud en su secuencia de aminoácidos primaria, sugiriendo esta homología un ancestro común (Asada *et al.* 1980). Ambas son detectadas tanto en organismos eucariotas como en procariotas lo que indica que podrían haber llevado una evolución independiente de las CuZn-SOD (Asada *et al.* 1980; Smith & Doolittle 1992).

Las Mn-SODs son proteínas homotetraméricas con una masa molecular nativa de 90-100 kDa (Palma *et al.* 1998; Corpas *et al.* 2006; Palma *et al.* 2013), mientras que las Fe-SODs suelen ser homodiméricas, con un tamaño molecular muy variable, y de las que existe poca información sobre la función específica que desempeñan en los diferentes tejidos celulares. Mediante aislamiento de peroxisomas de frutos de pimiento y análisis por transferencia de western, se comprobó que estos orgánulos contenían una Mn-SOD (Mateos *et al.* 2003). Posteriormente, estos resultados se corroboraron tras estudios proteómicos realizados a partir de los peroxisomas purificados de los frutos (Palma *et al.* 2015; Álvarez de Morales, 2016). La Fe-SOD es una de las isoenzimas más antiguas filogenéticamente hablando, aun siendo la menos estudiada en plantas, que son los únicos organismos superiores en los que se ha descrito. Se pensó por mucho tiempo que la localización de esta isoenzima era principalmente plastidial, tanto en plantas superiores como en algas (Bowler *et al.* 1994), pero también han sido identificadas Fe-SODs no cloroplásticas en mitocondrias de maíz (Srivalli & Khanna-Chopra 2001) y en el citosol de nódulos de leguminosas (soja y caupí), cuya función ha sido relacionada, entre otras, con procesos de fijación de nitrógeno (Moran *et al.* 2003; Asensio *et al.* 2012). Asimismo, se ha detectado en peroxisomas aislados de pétalos de clavel (Droillard and Paulin, 1990) y, más recientemente, en los peroxisomas de los frutos de pimiento se ha descrito la presencia de una Fe-SOD mediante análisis proteómico (electroforesis 2-D y MALDI-TOF/TOF) de dichos orgánulos (Palma *et al.* 2015; Álvarez de Morales 2016).

La identificación de las distintas isoenzimas de SOD se realiza normalmente mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas y tinción específica de los geles en presencia y ausencia de inhibidores específicos, según se indicó anteriormente en esta Tesis Doctoral. En la Tabla 2.1 se recopilan las principales características de las SODs de plantas.

Tabla 2.1. Main characteristics of the SOD types described in plants. Taken from (Álvarez de Morales 2016) and modified from (Palma *et al.* 2013).

Type of isozyme	Native Size (kDa)	Structure	Sucellular localization	Inhibitors
CuZn-SOD	32	Dimer	Chloroplast (stroma and thylakoids), cytosol, nuclei, apoplast and peroxisomes	KCN and H ₂ O ₂
Fe-SOD	23-36	Dimer	Chloroplast (stroma and thylakoids), mitochondria and peroxisomes	H ₂ O ₂
Mn-SOD	90-100	Tetramere	Mitochondria and peroxisomes	-

En esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo un análisis bioquímico y molecular de las SODs de pimiento en distintos órganos y situaciones, pero centrándonos fundamentalmente en los frutos de diferentes variedades y en la Fe-SOD, comparándose además con la Fe-SOD presentes en otras especies vegetales.

2.2 RESULTADOS/ RESULTS

2.2.1 Superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) en frutos de pimiento

❖ Caracterización de la Fe-SOD en distintos órganos de pimiento

El análisis en frutos de pimiento de la actividad SOD en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes se muestra en la Fig. 2.2, en la cual se aprecia la existencia de 4 isoenzimas que, por su sensibilidad a inhibidores específicos, correspondían con una Mn-SOD, una Fe-SOD y dos CuZn-SODs, designadas I y II en función de su movilidad creciente en el gel (Fig. 2.2). La figura Fig. 2.2a muestra cómo ciertas isoenzimas presentaban una mayor intensidad en los pimientos verdes, como la Mn-SOD, la Fe-SOD y la CuZn-SOD I. Sin embargo, la actividad de la CuZn-SOD II era mayor en los frutos rojos. La Fig. 2.2d muestra el análisis de la expresión proteica de la Fe-SOD mediante inmunoblot tras EGPA no desnaturizante donde se empleó un anticuerpo frente a Fe-SOD. Como se puede observar, la Fe-SOD mostraba una mayor expresión en frutos verdes que en rojos. Esta menor expresión era de un 23%, tras el análisis realizado con el procesador de imágenes Image J, y se correspondía con lo

observado en la actividad de esta isoenzima (Fig. 2.2a), según se comentó anteriormente.

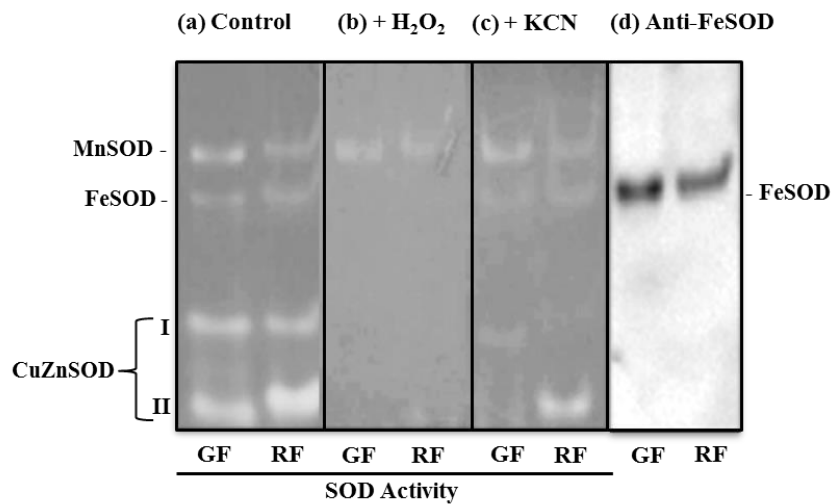


Figure 2.2. Superoxide dismutase (SOD) isozymes from green and red pepper fruits and immunoblot assay probed with an antibody against a Fe-SOD. (a) SOD isozymes were separated by native-PAGE (10% acrylamide) and stained by a photochemical method (20 μ g protein per lane). Gels were also incubated with specific inhibitors. (b) Gel preincubated with 5 mM H_2O_2 . (c) Gel preincubated with 2 mM KCN. (d) Western blotting of SODs from fruits extracts probed with an antibody against a Fe-SOD (1:5000 dilution). GF: Green fruit, RF: Red fruit.

Considerando que las Fe-SODs vegetales han sido las isoenzimas menos estudiadas y teniendo en cuenta los resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio sobre la presencia de una Fe-SOD en los peroxisomas de los frutos de pimiento, y su implicación en la maduración, en este capítulo hemos realizado un estudio de las SODs, pero prestando una mayor atención al perfil de la Fe-SOD en las diferentes condiciones estudiadas.

La actividad isoenzimática de las SODs se analizó en los diferentes órganos de plantas de pimiento del tipo California, incluyendo la raíz, el tallo, las hojas, la flor y los frutos, tanto verdes como rojos (Fig. 2.3a). Asimismo, se realizaron “inmunoblots” en condiciones nativas y desnaturizantes en los que se empleó un anticuerpo frente a la Fe-SOD de pimiento (Fig. 2.3b y c). En los distintos órganos fueron patentes las isoenzimas Mn-SOD, Fe-SOD (excepto en hojas) y CuZn-SOD I. Sin embargo, este patrón isoenzimático estaba mejor definido en los frutos, donde se apreciaban ligeras diferencias en la movilidad de algunas isoenzimas con respecto a los otros órganos (Fig. 2.3a). Se aprecia, además, cómo la actividad SOD era mayor en los frutos, las hojas y los tallos, frente a las raíces y las flores.

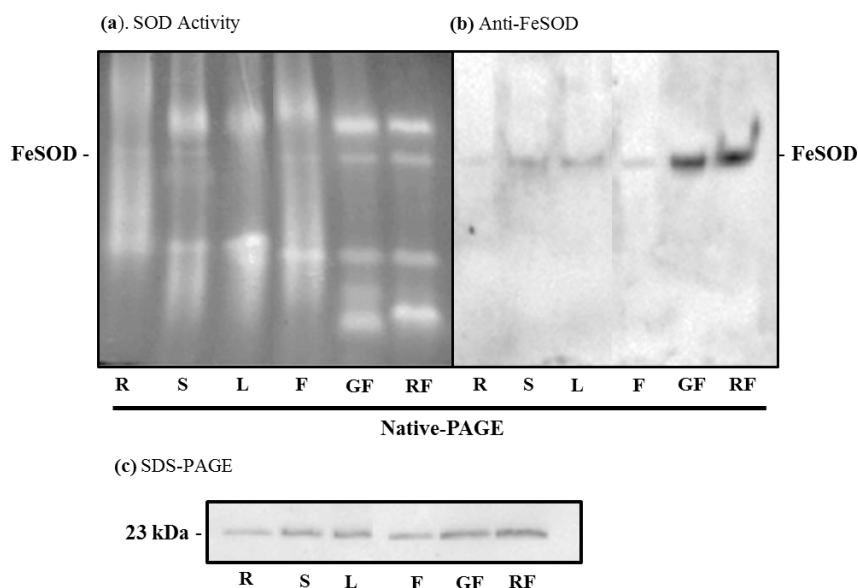


Figure 2.3. Superoxide dismutase (SOD) isozymes in the different organs of pepper plants and immunoblot analysis probed with an antibody against a Fe-SOD (1:5000 dilution). (a) Activity of SOD isozymes in the main organs of pepper plants. SODs were separated by native PAGE on 10% polyacrylamide gels and were stained by the photochemical nitroblue tetrazolium method. (b) Native western blot of distinct pepper organs extracts probed with an antibody against Fe-SOD (1:5000 dilution) (c) SDS-PAGE western blot using the antibody against Fe-SOD. R, roots; S, stems; L, leaves; F, flowers; GF, green fruit; RF, red fruit. Proteins (20 μ g per lane) were loaded for both non-denaturing and SDS-PAGEs.

Por otro lado, la expresión de la Fe-SOD en condiciones no desnaturizantes variaba en función del órgano analizado (Fig. 2.3b), donde esta isoenzima presentaba mayor expresión en los frutos, tallos y hojas en comparación con raíces y flores donde apenas se percibía la banda. Los resultados correspondientes al *immunoblot* tras las EGPA en condiciones desnaturizantes, mostraba como el contenido de la Fe-SOD seguía siendo mayor en los frutos seguido de tallos y hojas, frente a lo observado en raíces y flores (Fig. 2.3c). En dicho análisis se obtuvo una única banda inmunoreactiva de 23 kDa, presente en todos los órganos analizados.

❖ **Actividad y caracterización de las SODs en distintas variedades de pimiento autóctonas.**

El patrón isoenzimático de la SOD, así como la expresión proteica de la Fe-SOD se analizó en diferentes variedades de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Para el ensayo se utilizaron pimientos de Padrón proporcionados por el Consejo Regulador de la Denominación de Origen Protegida “Pemento de Herbón” (Herbón, A Coruña), pimientos de Piquillo y pimientos Alegría riojana proporcionadas por el Consejo

Regulador de la Denominación de Origen “Pimiento del Piquillo de Lodosa” (Lodosa, Navarra). En todos los ensayos se emplearon pimientos California (Syngenta Seeds, S.A., El Ejido, Almería) como referencia.

El patrón isoenzimático obtenido para todas las variedades de pimiento se muestra en la Fig. 2.4a. En todas ellas se observa el mismo patrón isoenzimático para todas las variedades de fruto de pimiento: cuatro isoenzimas que correspondían a una Mn-SOD, una Fe-SOD y dos CuZn-SODs (I y II), si bien eran patentes ciertas diferencias en función de la variedad. Al comparar las variedades autóctonas españolas de pimiento (líneas 1-6, Fig. 2.3a) frente a las de pimiento California (línea GF), por lo general, la intensidad de todas las isoenzimas aumentaba, a excepción del pimiento Padrón verde (línea 1) que mostraba una disminución e incluso la casi desaparición de isoenzimas como la Fe-SOD y la CuZn-SOD II (Fig. 2.4a). El aumento más acusado, con respecto a los frutos del tipo California, correspondía a las CuZn-SOD de todas las variedades.

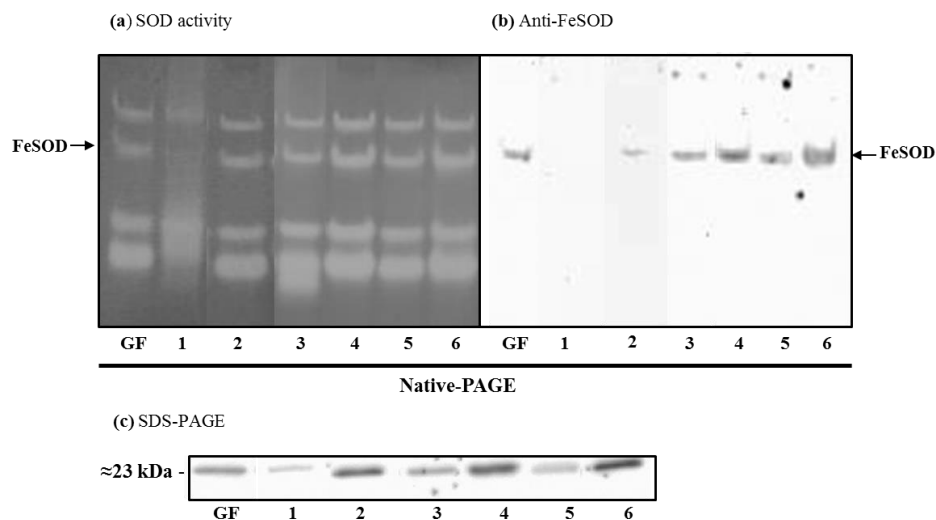


Figure 2.4. Isoenzymatic SOD activity and protein expression of Fe-SOD in different autochthonous Spanish pepper fruits. (a) Native polyacrylamide gel electrophoresis of pepper fruit with staining for SOD activity. (b) Immuno-blot probed with an antibody against a Fe-SOD (1:5000 dilution). Samples (30 µg proteins) were subjected to native electrophoresis on 10% acrylamide gels. (c) SDS-PAGE (4-20%) and immuno-blot (20 µg per lane) probed with an antibody against Fe-SOD (dilution 1:5000). GF: green fruit of California cultivar. Lane 1: green fruit of variety Padrón. Lane 2: red fruit of variety Padrón. Lane 3: green fruit of variety Piquillo. Lane 4: red fruit of variety Piquillo. Lane 5: Green fruit of variety Alegría riojana. Lane 6: Red fruit of variety Alegría Riojana.

El análisis realizado para cada variedad de pimiento revelaba que en pimientos de Padrón, durante el proceso de maduración se producía un incremento de la actividad de las SODs que podía apreciarse tanto en la actividad enzimática donde se daba un incremento de hasta 6 veces más en enzimas como las CuZn-SODs y el doble en la Mn-SOD en frutos rojos (Fig. 2.4a, líneas 2 y 3; Image J), como en los *immunoblot* en condiciones nativas (Fig. 2.4b, líneas 1-2) y desnaturalizantes (Fig. 2.4c, líneas 1-2), realizados con un anticuerpo frente a una Fe-SOD de pimiento, en los cuales la expresión aumentaba hasta 6 veces más en rojo que verde (Image J). Los pimientos de Piquillo respondían de igual forma, produciéndose un incremento en la actividad SOD de 2 a 4 veces más en frutos rojos respecto a los verdes (Fig. 2.4a, líneas 3-4); la expresión de la Fe-SOD volvía a mostrar un aumento en frutos maduros (Fig. 2.4b y 2.4c, líneas 3-4). Finalmente, los pimientos de Alegría riojana sufrían el mismo aumento en frutos rojos, tanto en actividad SOD donde se producían incrementos de hasta 3 veces más, como en la expresión de la Fe-SOD que era más del doble. En todas las variedades, y tal como cabría esperar, el tamaño molecular de la subunidad de la Fe-SOD era de aproximadamente 23 kDa, correspondiendo este valor con el obtenido en análisis anteriores para pimientos del tipo California (Fig. 2.4c).

❖ **Caracterización de la Fe-SOD en diferentes especies vegetales**

Dado la especificidad del anticuerpo frente a la Fe-SOD en los estudios de frutos de pimiento, se llevó a cabo una caracterización del mismo, analizándose su aplicabilidad en ensayos de transferencia de western con distintas especies vegetales. Se prepararon muestras de especies como la mostaza (*Brassica juncea*), leguminosas (*Lotus japonicus* y *Pisum sativum*), trigo (*Triticum durum*), *Arabidopsis thaliana* y pimiento (*Capsicum annuum*). Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 2.5. Tal y como se aprecia en la Fig. 2.5a), el número y tipo de isoenzimas de SOD cambia dependiendo de la especie vegetal. Esa variabilidad se encontraba también en los resultados del *immunoblot* de geles nativos con el anticuerpo frente a la Fe-SOD (Fig. 2.5b), donde se aprecia la diferente movilidad de esta isoenzima en función de la especie vegetal. La co-migración de bandas de actividad SOD y del *immunoblot* permite identificar las isoenzimas Fe-SOD de las especies analizadas. Así, se pudo detectar la presencia de una Fe-SOD en *B. juncea*, *T. durum* y *A. thaliana*. No obstante, cuando se empleó el anticuerpo en los ensayos de EGPA en condiciones desnaturalizantes, se obtuvieron resultados dispares (Fig. 2.5c). Los tamaños obtenidos para la Fe-SOD de cada una de las especies

analizadas fueron: en *Brassica juncea* aparecieron dos bandas de 23 kDa y 36 kDa; *Lotus japonicus* presentaba una única banda inmunoreactiva correspondiente a 35,5 kDa; tanto en *Triticum durum* como *Pisum sativum* se obtuvieron bandas de 34,5 y 34,3 kDa respectivamente; y, finalmente, en *Arabidopsis thaliana* aparecieron dos bandas de 30,5 y 35,6 kDa.

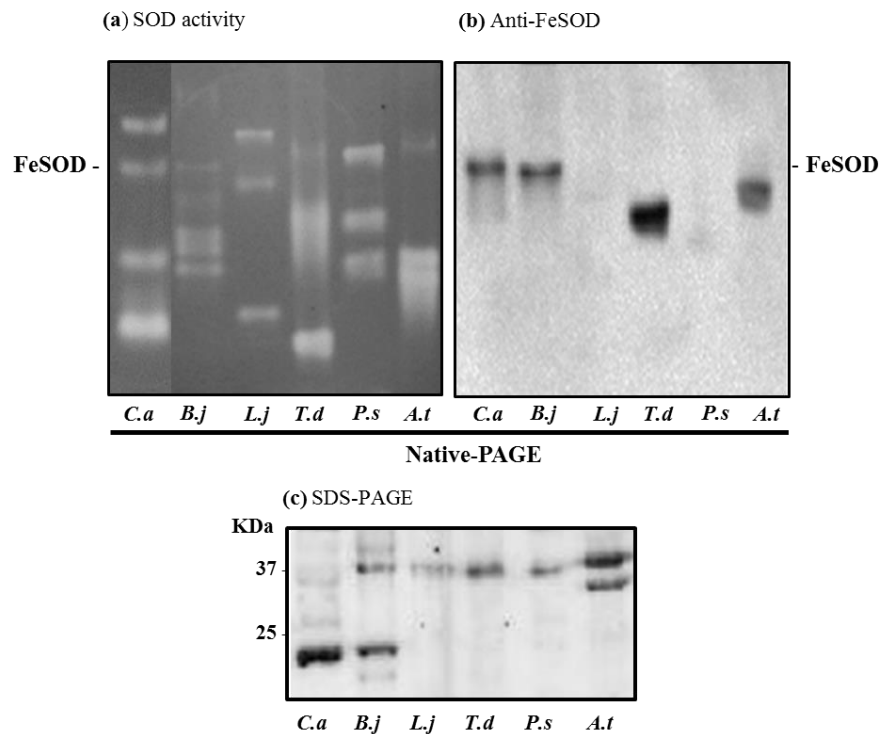


Figure 2.5. Isoenzymatic SOD activity and protein expression of Fe-SOD in different plant species. (a) Native polyacrylamide gel of different plant species stained for SOD activity (b) Immuno-blot probed with an antibody against a Fe-SOD (1:5000 dilution). Samples (30 μ g proteins) were subjected to electrophoresis on 10% acrylamide gels. (c) SDS-PAGE (4-20%) and immunoblot (20 μ g per lane) probed with antibody against a Fe-SOD (dilution 1:5000). *C.a*, *Capsicum annum* fruits; *B.j*, *Brassica juncea* leaves; *L.j*, *Lotus japonicas* leaves; *T.d*, *Triticum durum* leaves; *P.s*, *Pisum sativum* leaves; *A.t*, *Arabidopsis thaliana* leaves, In panels (a) and (b), the migration of Fe-SOD from pepper fruits is depicted.

❖ Localización subcelular de la Fe-SOD en frutos de pimiento

En análisis preliminares del proteoma de peroxisomas de frutos de pimiento se identificaron y analizaron una serie de proteínas con el fin de profundizar en el conocimiento de los mecanismos reguladores que subyacen al proceso de maduración. Entre dichas proteínas, que se identificaron por electroforesis 2-D y MALDI-TOF/TOF de peroxisomas de frutos, se encontraban varias superóxido dismutasas, y dentro de ellas, la Fe-SOD (Álvarez de Morales 2016), lo que cobraba interés por su posible

localización en peroxisomas, ya que los primeros estudios en los que se llevó a cabo la caracterización de las isoenzimas de SOD presentes en estos orgánulos sólo detectaron una Mn-SOD (Mateos *et al.* 2003). Así, se realizaron una serie de ensayos que permitieron esclarecer la localización subcelular de la Fe-SOD en los frutos de pimiento. Se realizó el análisis de la actividad SOD por electroforesis en condiciones nativa de matrices de peroxisomas purificados y concentrados tanto de pimientos verdes como rojos. Dicho análisis mostró la presencia de dos isoenzimas, la Mn-SOD, más intensa en ambos tipos de pimientos, y una Fe-SOD que mostraba mayor intensidad en los frutos verdes (Fig. 2.6a). Posteriormente, las matrices peroxisomales fueron analizadas por SDS-EGPA con tinción de nitrato de plata, lo que permitió visualizar su perfil proteico (Fig. 2.6b) y su correspondiente *western blot* ensayado con el anticuerpo frente a la Fe-SOD, donde aparecía un banda inmunoreactiva de 23 kDa (Fig. 2.6c). Dicha banda era más intensa en los peroxisomas de los frutos verdes.

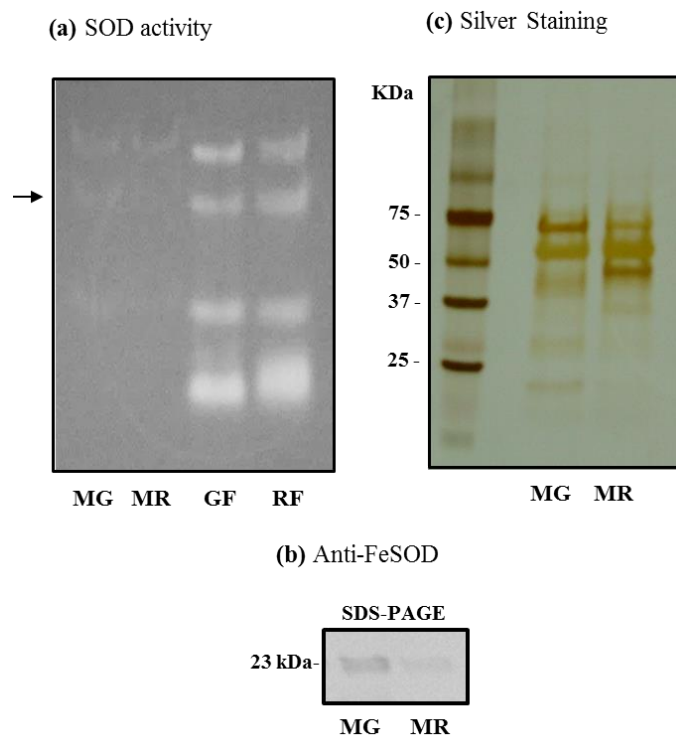
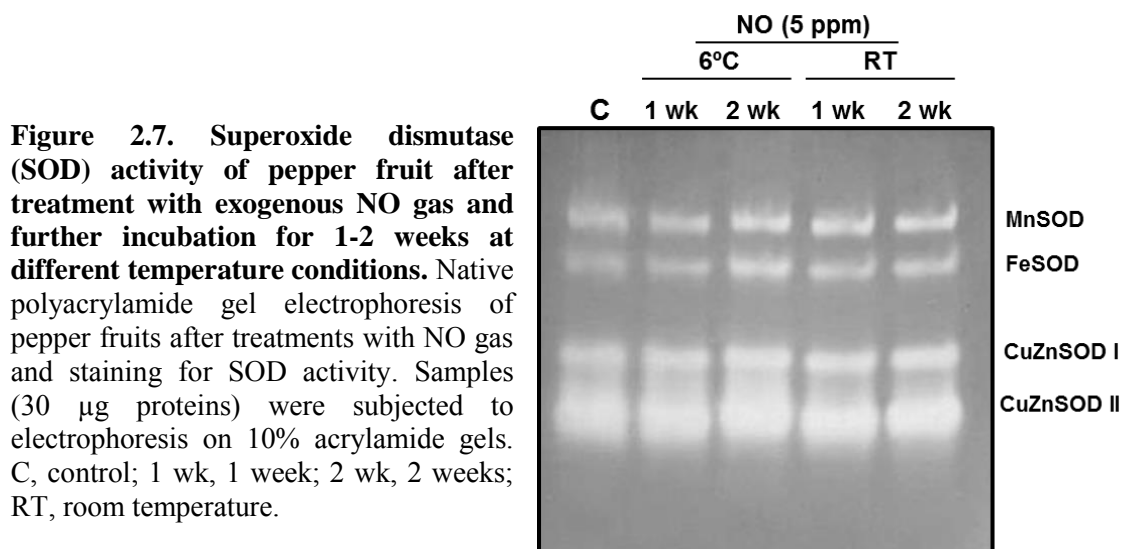


Figure 2.6. Analysis of SOD activity and Western blotting in peroxisomes from green and red pepper fruits. (a) SOD activity of peroxisomal matrices subjected to native-PAGE (10% acrylamide) and stained by a photochemical method. (b) SDS-PAGE and silver-staining of peroxisomal matrices. (c) Immunoblot of peroxisomal matrices from green and red pepper fruits probed with an antibody against a Fe-SOD (1:5000 dilution). MG, peroxisomal matrices from green pepper; MR, peroxisomal matrices from red pepper; GF, green fruit; RF, red fruit.

❖ Efecto del NO sobre la actividad SOD en frutos de pimiento

Con el propósito de analizar el posible papel del NO exógeno en el comportamiento de los distintos antioxidantes de pimiento, tal y como se ha mencionado en el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral, se estudió la actividad SOD en frutos de pimiento sometidos a tratamiento con NO. La Fig. 2.7 muestra el análisis de las distintas SODs de los frutos expuestos a 5 ppm de NO. Los principales cambios observados se restringían a la actividad de la Mn-SOD y la Fe-SOD, con un aumento de actividad en todos los tipos de tratamientos. Así, se detectaron incrementos de más del doble en la Fe-SOD, principalmente en aquellos pimientos almacenados durante dos semanas, tanto a baja temperatura como a temperatura ambiente, mientras que los aumentos de la Mn-SOD eran más apreciables tras el almacenamiento a 6°C durante dos semanas, y en los dos tiempos muestreados a temperatura ambiente.



❖ Modulación de la actividad SOD isoenzimática en frutos de pimiento en presencia de donadores de NO, agentes reductores y oxidantes

Se analizó la actividad SOD de frutos de pimiento verdes y rojos preincubadas *in vitro* con diversos donadores de NO y ONOO⁻, así como con agentes reductores (GSH y DTT) y oxidantes (H₂O₂). Posteriormente, se analizó la actividad isoenzimática en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones no desnaturizantes. Como agente donador de ONOO⁻ se empleó el SIN-1, a una concentración de 4 mM, como donadores de NO el GSNO o el DeaNONOato, a 4 mM, como agentes reductores se emplearon el glutatió

reducido (GSH) 4 mM y el DTT 10 mM, y como oxidante el peróxido de hidrógeno, 10 mM.

La Fig. 2.8a muestra el análisis realizado de las distintas isoenzimas de SOD en muestras de pimientos verdes preincubadas con los distintos agentes químicos. De forma general, no se observa ningún efecto en la intensidad de bandas de las distintas isoenzimas de SOD a excepción del DTT que provocaba una clara disminución de las CuZn-SOD I y II.

Por otro lado, se observó que la pre-incubación *in vitro* con H₂O₂ no afectaba a las isoenzimas CuZn-SOD y Fe-SOD, a pesar de que es un inhibidor específico de ambas (Fig. 2.8a) según es usado para su identificación en geles. Por ello, se decidió incubar los geles con H₂O₂ 5 mM una vez concluida la electroforesis para observar si el efecto era reversible (Fig. 2.8b). Como era previsible, se inhibieron las dos CuZn-SODs y la Fe-SOD, lo que prueba que dicha inhibición por H₂O₂ es reversible y, por tanto, no produce alteraciones en el centro activo de la enzima.

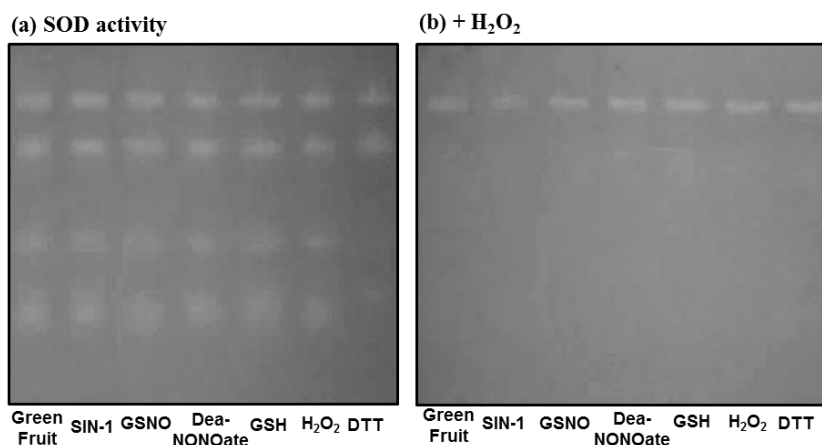


Figure 2.8. Analysis on gel electrophoresis of the activity of the different SOD isozymes of green pepper fruit samples pre-incubated with different chemicals. (a) Samples were pre-incubated with 4 mM SIN-1, 4 mM GSNO, 4 mM DeaNONOate, 4 mM GSH; 10 mM H₂O₂, and 10 mM DTT. After electrophoresis gels were stained for SOD activity. **(b)** Samples were processed as in panel (a) but the gel was pre-incubated with 5 mM H₂O₂ before staining for SOD activity.

El análisis realizado con muestras de pimiento rojo, presentaba la misma tendencia que los observados con frutos verdes, a excepción del DTT que no producía ningún efecto (Figs. 2.9 a, b).

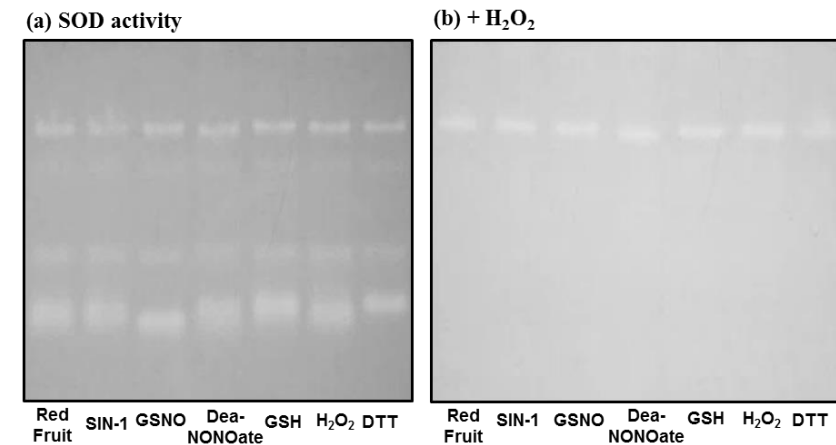


Figure 2.9. Analysis on gel electrophoresis of the activity of the different SOD isozymes of red pepper fruit samples pre-incubated with different chemicals. (a) Samples were pre-incubated with 4 mM SIN-1, 4 mM GSNO, 4 mM DeaNONOate, 4 mM GSH; 10 mM H₂O₂, and 10 mM DTT. After electrophoresis gels were stained for SOD activity. **(b)** Samples were processed as in panel (a) but the gel was pre-incubated with 5 mM H₂O₂ before staining for SOD activity.

En resumen, se puede concluir que ni el ONOO⁻ ni el óxido nítrico parecen afectar a ninguna de las isoenzimas de SOD en frutos de pimiento.

❖ Efecto de diferentes estreses abióticos sobre la actividad isoenzimática SOD en plantas de pimiento.

Para tener una visión más completa de la función de la SOD en la fisiología de esta especie vegetal, y dado que este sistema metaloenzimático está implicado en la respuesta de plantas a distintos estreses, se llevó a cabo un estudio de las distintas isoenzimas de SOD en plantas de pimiento sometidas a distintos estreses abióticos, tales como el daño mecánico o la alta intensidad lumínica, prestando especial atención a la Fe-SOD.

➤ Daño Mecánico

Se analizaron extractos de hojas de pimiento control y hojas que habían sido dañadas mecánicamente mediante heridas provocadas por pinzamientos (Material y Métodos 2.2).

El fenotipo de las plantas de pimienta sometidas a daño mecánico durante 4 horas se muestra en la Fig. 2.10. El pinzamiento realizado sobre las hojas de pimienta causó un enrollamiento hacia abajo de las mismas al cabo del tiempo indicado.



Figure 2.10. Phenotype of 30 days old pepper plants after 4 h of mechanical wounding applied to pepper leaves by using forceps.

Tanto en las muestras de hojas control como en las dañadas el patrón isoenzimático de la SOD mostraba 4 isoenzimas (Fig. 2.11a), correspondientes a una Mn-SOD, Fe-SOD y la CuZn-SOD I, y la CuZn-SOD II, que apenas se percibía en ambos casos. El análisis de la abundancia de las distintas isoenzimas de SOD en geles en condiciones no desnaturizantes mostró un aumento de la actividad en las plantas que habían sido sometidas a estrés. El análisis de imagen realizado mostró un incremento de un 20% para la Mn-SOD, un 45% para la Fe-SOD y un 36% en la CuZn-SOD I.

El análisis de expresión proteica de la Fe-SOD mediante *western blot* (Fig. 2.11b) con hojas de pimienta mostró un ligero aumento (20%) de su expresión en las hojas sometidas a daño mecánico frente a las control, coincidiendo estos datos con los obtenidos anteriormente en los geles de actividad. En ambas muestras se obtuvo una banda inmunoreactiva de 23 kDa, al igual que ya se había descrito anteriormente en este capítulo.

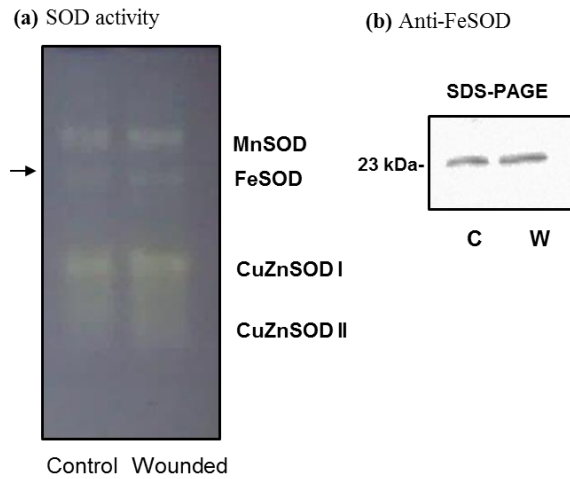


Figure 2.11. Superoxide dismutase (SOD) activity in native-PAGE and protein expression of Fe-SOD from pepper leaves after 4 h of mechanical wounding (W) applied to leaves. (a) Native polyacrylamide gel electrophoresis of pepper leaves stained for SOD activity. Samples (30 µg protein) were subjected to electrophoresis on 10% acrylamide gels. **(b)** SDS-PAGE (4-20% acrylamide)-Immunoblot of samples (20 µg per lane) probed with an antibody against a Fe-SOD pepper. (dilution 1:10000).

➤ **Estrés por alta intensidad lumínica**

La peroxidación lipídica es reconocida como como un marcador de daño oxidativo provocado por ROS. Para analizar dicho daño en plantas de pimienta sometidas a alta intensidad lumínica, se utilizó un método histoquímico mediante el reactivo de Schiff que permite detectar los aldehídos originados a partir de los peróxidos lipídicos (Yamamoto *et al.* 2001). El resultado de la tinción con dicho reactivo se muestra en la Fig. 2.12. La coloración púrpura corresponde a la presencia de peroxidación lipídica en los tejidos. Se observó mayor intensificación de la coloración en los nervios principales y secundarios de las hojas expuestas a alta intensidad lumínica durante 4 h y 8 h; sin embargo en aquellas expuestas a 6 h esta intensificación no era significativa.

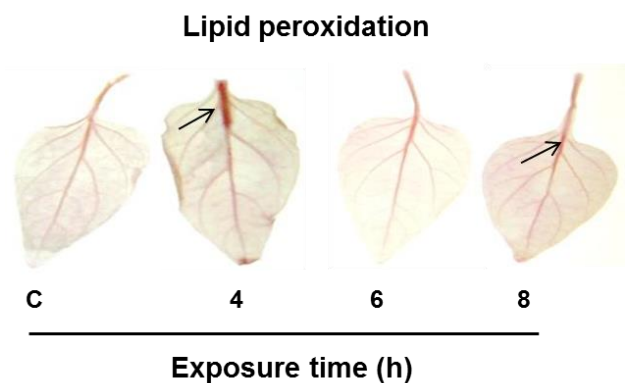
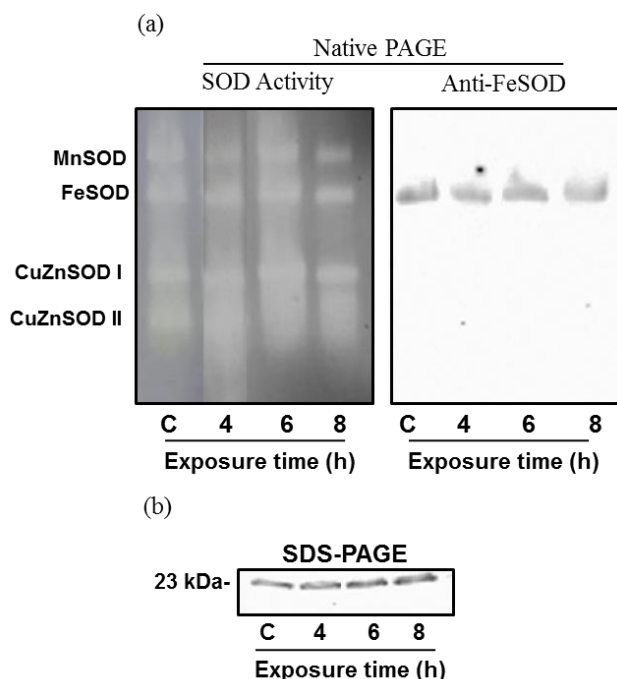


Figure 2.12. Histochemical detection of lipid peroxidation in leaves of pepper plants exposed to high light intensity. The red/purple colour indicates the presence of lipid peroxidation detected with the Schiff's reagent.

El patrón isoenzimático de SOD también fue analizado en hojas de pimiento de plantas sometidas a alta intensidad lumínica durante diferentes tiempos (4-8 h). El resultado obtenido tras el análisis de la actividad SOD se muestra en la Fig. 2.13a. El perfil de las isoenzimas no mostró cambios significativos en la intensidad de bandas en aquellas muestras sometidas a estrés frente a las control. La expresión de la Fe-SOD tanto en condiciones nativas (Fig. 2.13a) como en condiciones desnaturalizantes (Fig. 2.13b) tampoco mostró cambios significativos.

Figure 2.13. Superoxide dismutase (SOD) activity and protein expression of Fe-SOD in leaves of pepper plants exposed to high light intensity. (a) Native polyacrylamide gel electrophoresis of pepper leaves stained for SOD activity. Samples (30 µg protein) were subjected to electrophoresis on 10% acrylamide gels and immunoblot of leaves from pepper plants probed with an antibody against a Fe-SOD (1:10000 dilution). **(b)** SDS-PAGE (4-20%) and immunoblot of samples (20 µg per lane) probed with antibody against Fe-SOD (dilution 1:10000).



2.3 DISCUSIÓN/ DISCUSSION

En plantas superiores, las superóxido dismutasas (SODs) han sido estudiadas bajo diferentes aspectos, incluyendo su distribución filogenética, propiedades bioquímicas y moleculares, estructura y función, regulación enzimática, localización subcelular y su papel en estreses tanto abióticos como bióticos, (Bridges & Salin 1981; del Río *et al.* 1983; Bowler *et al.* 1994; Bueno *et al.* 1995; Corpas *et al.* 1998; Alscher *et al.* 2002; Airaki *et al.* 2012; Palma *et al.* 2013). Sin embargo, aun existe poca información acerca de la función específica de cada isoenzima en los diferentes tejidos celulares, y la información es específicamente menos prolija en las características de las Fe-SODs. Como se ha mencionado anteriormente, el pimiento (*Capsicum annuum* L.) es una de las hortalizas con mayor demanda a nivel mundial, presentado un alto interés

agronómico, comercial e incluso económico, debido entre otros muchos factores a sus características nutricionales. Los mecanismos antioxidantes que tienen lugar durante las etapas del desarrollo, así como en la maduración y post-cosecha son objeto de estudio durante esta Tesis Doctoral, por lo que el objetivo marcado en este capítulo fue el estudio bioquímico y molecular de las SODs de pimiento en diversas situaciones, centrándonos fundamentalmente en la participación de la Fe-SOD en los procesos investigados. Dicho análisis se ha llevado a cabo bajo diferentes condiciones de estrés, en diferentes especies, diferentes variedades de pimiento y en pimientos expuestos a atmósferas enriquecidas con NO y almacenados bajo dos condiciones de temperatura.

Uno de los cambios que tiene lugar durante los procesos de maduración y senescencia es el aumento de los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) así como de otras ROS que dan lugar a cambios metabólicos importantes a nivel celular, como son los daños en la membrana (del Río *et al.* 1998; Martí *et al.* 2009). Estudios pioneros sobre la actividad SOD en matrices de peroxisomas de pimiento sugerían que los niveles de anión superóxido podrían ser mayores en frutos rojos, estableciendo que el $O_2^{\cdot-}$ podría tener un papel importante en la maduración de frutos de pimiento, y sería controlado por las SODs (Mateos *et al.* 2003). En trabajos recientes realizados sobre frutos de pimiento se ha observado cómo durante el proceso de la maduración se producía un incremento en los niveles de H_2O_2 y de $O_2^{\cdot-}$ (Endo & Imahori 2016). Estos daños son acentuados en situaciones de estrés tanto abiótico como biótico donde se ha comprobado que aumenta la peroxidación lipídica tal y como se ha observado en los resultados de esta Tesis Doctoral.

El patrón isoenzimático de las SODs se ha visto que puede cambiar durante la maduración e incluso durante la post-cosecha. Estudios sobre la modulación de antioxidantes en ciruela india (*Ziziphus mauritiana* Lamk) pusieron en evidencia que el patrón de isoenzimas cambiaba en función del estado en el cual se encontraba el fruto, observándose la inducción de una isoenzima SOD que podría estar relacionada con la conservación del fruto (Kumar *et al.* 2014). Los resultados obtenidos durante este trabajo nos indican que la Fe-SOD tendría un papel esencial durante el desarrollo de la planta de pimiento siendo mayor su expresión y actividad en órganos como los tallos y hojas y, principalmente, en frutos. Estos datos concuerdan con trabajos realizados sobre plantas de pimiento donde se observaba un patrón similar (Airaki *et al.* 2012). De la misma forma se ha descrito una menor expresión de enzimas como la Fe-SOD en las

raíces de leguminosas frente a las hojas (Asensio *et al.* 2012). La mayor expresión de la Fe-SOD en tejidos fotosintéticos podría estar relacionada con una de las localizaciones de esta enzima, los cloroplastos, orgánulo presente en las células fotosintéticas por excelencia. Dicha abundancia relativa se ha encontrado también en hojas de olivo (Corpas *et al.* 2006), y en cloroplastos de hojas de tabaco, donde se observaba que esta isoenzima era más abundante que la CuZn-SOD detectada en este orgánulo (Van Camp *et al.* 1997).

La localización subcelular de la Fe-SOD también ha sido objeto de estudio durante este trabajo; se analizaron matrices de peroxisomas de frutos de pimiento y se estudió tanto la expresión de esta proteína con un anticuerpo específico frente a una Fe-SOD vegetal como de la actividad enzimática. Los resultados de *immunoblot* mostraban que esta proteína se expresaba en matrices de peroxisomas, lo que se correspondía con los análisis de actividad enzimática. Dicha localización peroxisomal de la Fe-SOD ya había sido descrita con anterioridad por Droillard and Paulin (1990) en pétalos de clavel y, muy recientemente, en estudios proteómicos realizados por nuestro grupo donde se detectó la Fe-SOD como posible proteína peroxisomal (Álvarez de Morales 2016).

Tal y como se ha especificado anteriormente, el número y tipo de isoenzimas de SOD varía en función de la especie y etapa del desarrollo. Dicha variabilidad se ha descrito en los estudios realizados sobre diferentes especies vegetales. En concreto, en limonero (*Citrus limonum* L, perteneciente a la familia de las Rutáceas) se han detectado dos Fe-SODs en las hojas (Sevilla *et al.* 1984; Almansa *et al.* 1991); en guisante (*Pisum sativum* L, familia de las Fabáceas) se ha descrito una Fe-SOD (Gómez *et al.* 1999); en pimiento (*Capsicum annuum* L, de la familia de las Solanáceas) se ha descrito una Fe-SOD (Airaki *et al.* 2012); otra Fe-SOD ha sido identificada olivo (*Olea europaea* L, perteneciente a la familia de las Oleáceas)(Corpas *et al.* 2006; López-Huertas & del Río 2014); y tres en *Arabidopsis* (Kliebenstein *et al.* 1998). En estudios recientes sobre el número y tipo de SOD en *Cakile marítima*, perteneciente a la familia de las Brasicáceas, se ha identificado una Fe-SOD. Sin embargo, era la isoenzima que más actividad expresaba en todos los órganos analizados (Houmani *et al.* 2016). Durante este capítulo se han analizado diferentes especies vegetales pertenecientes a distintas familias, y se ha corroborado la variación existente entre los patrones enzimáticos de las SODs, así como entre las Fe-SODs de dichas especies, mostrando diferente expresión proteica y diferente masa molecular de las respectivas subunidades.

Todos estos casos ponen en evidencia la heterogeneidad en la distribución de las isoenzimas de SOD en diferentes especies de plantas superiores, sugiriendo esto que cada tipo de isoenzima podría tener una función específica, probablemente relacionada con su localización subcelular (Corpas *et al.* 2006). El tamaño molecular obtenido para la subunidad de Fe-SOD de pimiento en los análisis realizados fue de alrededor de 23 kDa, dato que se corresponde con otros obtenidos en otras especies vegetales (Asensio *et al.* 2012; Houmani *et al.* 2016).

En trabajos previos se ha descrito que el NO está implicado en los procesos de maduración de pimiento (Chaki *et al.* 2015). Los análisis realizados durante este trabajo ponen de manifiesto cómo el NO provoca cambios en el patrón isoenzimático de las SODs de los pimientos expuestos a atmósferas enriquecidas con dicho gas, induciendo algunas de las isoenzimas, en concreto la Fe-SOD. Con el fin de ahondar sobre el efecto de NO en nuestro modelo vegetal, los ensayos *in vitro* realizados con diferentes donadores de NO y ONOO⁻ mostraban la potencial modulación de los distintos tipos de SODs en frutos de pimiento. Se ha descrito que el ONOO⁻ reduce la actividad de distintos tipos de SODs en proteínas recombinantes de *Arabidopsis*, siendo la isoenzima más sensible la Mn-SOD (Holzmeister *et al.* 2015). Estos resultados eran similares a los ya obtenidos en Mn-SODs de humanos y bacterias, donde se mostraba una alta sensibilidad a ONOO⁻ (MacMillan-Crow *et al.* 1998; Surmeli *et al.* 2010), aunque no se observó cambios significativos con el GSNO. Además de su papel como enzimas antioxidantes, las SODs tienen funciones que hoy día han sido escasamente estudiadas relacionadas con la regulación, composición y señalización por RNS. Interacciones entre radicales libres como el O₂⁻ y el NO son importantes bajo condiciones de estrés (Groß *et al.* 2013). El exceso de O₂⁻ durante el estrés oxidativo provoca una limitación en la disponibilidad del NO a través de la formación de ONOO⁻ (Corpas & Barroso 2016). Por lo que las SODs compiten a su vez con el NO por el O₂⁻, previniendo de este modo la formación de ONOO⁻, mientras que se favorece la acumulación de NO (Holzmeister *et al.* 2015). Aunque nuestros datos no aportan evidencias claras de la interacción, al menos *in vitro*, entre el NO y las SODs, es de destacar que, dada la localización multiorganular de estas isoenzimas y el efecto local del NO, convendría realizar en el futuro estos estudios a nivel de los orgánulos purificados, de manera que se obtenga una imagen más próxima de lo que puede ocurrir dentro de la célula.

CAPITULO 3

METABOLISMO DEL ASCORBATO EN FRUTOS DE PIMIENTO: BIOSÍNTESIS Y CATABOLISMO.

CHAPTER 3

ASCORBATE METABOLISM IN PEPPER FRUITS: BIOSYNTHESIS AND CATABOLISM

3.1 INTRODUCCIÓN/ INTRODUCTION

Debido a la relevancia del ascorbato en el metabolismo de los frutos de pimiento (Palma *et al.* 2015), en este capítulo se ha prestado especial atención a la caracterización de las rutas metabólicas en las que está implicado este antioxidante. Para ello se ha completado la caracterización de una de las enzimas implicadas en la biosíntesis de ascorbato, la L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH), analizándose su modulación por diferentes RNS, y se han investigado algunas enzimas esenciales en rutas del catabolismo del mismo. Por otro lado, se ha realizado el estudio de diferentes metabolitos relacionados con la degradación del ascorbato y su modulación de los frente a RNS. Los resultados obtenidos a lo largo de este capítulo podrían aportar luz o explicar la razón por la cual los niveles de ascorbato se incrementan durante la maduración de los frutos de pimiento.

El ácido ascórbico (vitamina C) es uno de los antioxidantes más potentes que se sintetizan por la mayoría de los seres vivos, exceptuando primates (incluyendo humanos), cobayas, murciélagos y algunas aves (Nishikimi *et al.* 1976; Kiuchi *et al.* 1982; Davey *et al.* 2000; Valpuesta & Botella 2004; Palma *et al.* 2011). Dentro de las células vegetales, esta molécula es ubicua y puede ser detectada en los diferentes compartimentos subcelulares así como en el apoplasto (Horemans *et al.* 2000a; Horemans *et al.* 2000b; Smirnoff 2000; Palma *et al.* 2011; Palma *et al.* 2015). Como antioxidante, el ascorbato puede interactuar con un buen número de ROS y además, forma parte de la reacción de eliminación de peróxido de hidrógeno, actuando como donador electrónico para la ascorbato peroxidasa (APX), ya sea como reacción individual o formando parte de la primera fase del ciclo ascorbato-glutatión en plantas (ruta Foyer- Halliwell-Asada).

A nivel fisiológico, se ha observado la relación de ácido ascórbico con la respuesta frente a patógenos, la síntesis de hormonas, expresión de genes, división y crecimiento celular, floración, senescencia, muerte celular programada o apoptosis, y movimiento estomático de las células guarda, entre otros eventos (Chen & Gallie 2004; Foyer & Noctor 2005; Linster & Clarke 2008; Palma *et al.* 2011). Debido a esta multifuncionalidad, el ascorbato es considerado un tampón redox en las células vegetales (Foyer & Noctor 2005). En trabajos recientes se ha propuesto que el ascorbato

amortigua los cambios metabólicos que se dan durante la maduración del pimiento actuando como un conservante que aumenta la vida útil del fruto (Palma *et al.* 2015).

La biosíntesis de ascorbato en plantas ha sido objeto de muchas investigaciones, principalmente en aquellas especies destinadas a consumo humano. Así, aunque las principales rutas de biosíntesis están bien establecidas según se describió en la Introducción de esta Tesis Doctoral (Smirnoff *et al.* 2004; Valpuesta & Botella 2004; Conklin *et al.* 2006; Ishikawa *et al.* 2006; Wolucka & Van Montagu 2007; Linster & Clarke 2008; Wheeler *et al.* 2015), en estos últimos años se han llevado a cabo estudios de transcripción y expresión con el fin de entender la regulación tan compleja que tiene lugar en dichas rutas (Imai *et al.* 2009; Li *et al.* 2010; Cronje *et al.* 2012; Xu *et al.* 2013; Yoshimura *et al.* 2014; Liu *et al.* 2015; Yan *et al.* 2015).

Hasta ahora habían sido descritas tres rutas de biosíntesis de ascorbato principalmente, según se vió en el apartado 5.2.2 de la Introducción de esta Tesis. La ruta más consensuada y de la que se tiene más información es la ruta de la L-galactosa, en la cual tiene lugar la oxidación de la L-galactono-1,4-lactona (GalL) a ácido ascórbico como paso final. Esta oxidación es llevada a cabo por la enzima **L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa** (GalLDH; EC 1.3.2.3), en una reacción en la que se produce una transferencia directa de electrones desde la GalL al citocromo *c* localizado en la membrana mitocondrial interna (Wheeler *et al.* 1998; Bartoli *et al.* 2000; Millar *et al.* 2003; Hervás *et al.* 2013; Szarka *et al.* 2013). Los cDNAs que codifican la GalLDH han sido caracterizados en numerosas especies como la coliflor, la batata, la fresa, el tomate, el tabaco, el melocotón, y la rosa así como en *Arabidopsis*, entre otros, donde se ha descrito también su estructura (Ostergaard Jens 1997; Imai *et al.* 1998; Yabuta *et al.* 2000; Tamaoki *et al.* 2003; An *et al.* 2007; Imai *et al.* 2009), y recientemente se ha descrito la caracterización de la GalLDH de frutos de pimiento (Rodríguez-Ruiz *et al.* 2017).

La GalLDH ha sido localizada en la membrana mitocondrial interna, donde forma parte de una estructura de 850 kDa asociada al complejo NADH deshidrogenasa (complejo I) en la cadena respiratoria (Siendones *et al.* 1999). Aquí, la proteína está integrada en dos subcomplejos proteicos de aproximadamente 470 y 420 kDa donde se ha comprobado cómo esta proteína tiene un papel esencial en la formación del complejo I, actuando como un factor de ensamblaje (Schertl *et al.* 2012; Bartoli *et al.* 2016;

Schimmeyer *et al.* 2016). En frutos de pimiento, se determinó la localización de esta enzima en mitocondrias mediante el aislamiento de estos orgánulos a través de centrifugaciones diferenciales y gradientes de densidad (Jiménez *et al.* 2002). En base a datos publicados recientemente (Rodríguez-Ruiz *et al.* 2017), en frutos de pimiento la GalLDH podría estar unida a la membrana mitocondrial a través, de al menos, un pequeño dominio transmembrana de unos 20 aminoácidos, siendo periférico el resto de la estructura proteica (Fig. 3.1). Esta estructura pivotante podría tener un papel crucial en la interacción con otras oxidasas, pudiendo esto mejorar la respiración mitocondrial, la que a su vez estaría asociada a la síntesis de ascorbato. No obstante, es necesario un estudio más exhaustivo sobre este tema ya que diversos autores han indicado tanto la presencia de varias regiones intermembrana como de localizaciones periféricas para dicha proteína (Imai *et al.* 1998; Siendones *et al.* 1999; Bartoli *et al.* 2000; Leferink *et al.* 2008; Schertl *et al.* 2012).

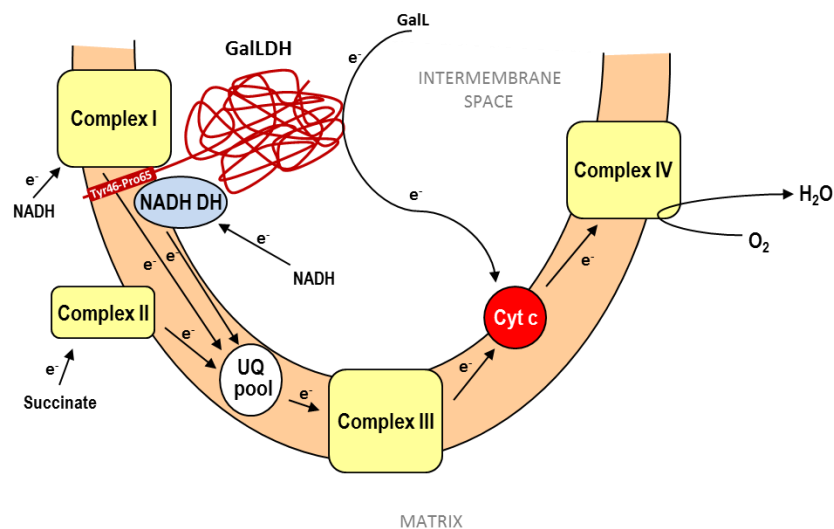


Figure 3.1. Electron fluxes in the mitochondria inner membrane in pepper fruits. Complexes I, II, III and IV from the mitochondrial electron transfer chain are depicted. GalLDH, galactono-1,4-lactone dehydrogenase. GalL, galactono-1,4-lactone. NADH DH, dehydrogenase associated to Complex I. UQ pool, ubiquinone pool. Cyt *c*, cytochrome *c*. GalLDH contains a transmembrane domain (Tyr46-Pro65) and is able to provide electrons directly to cytochrome *c* for reduction of oxygen at the Complex IV site. Picture taken from Rodríguez-Ruiz *et al.* 2017.

La asociación, tanto estructural como funcional, de esta proteína con el complejo I mitocondrial (Schertl *et al.* 2012; Schimmeyer *et al.* 2016) podría estar fortalecida por

la presencia de dominios de unión del FAD, dominios de unión de FAD/FMN a deshidrogenasas (GlcD), y por dominios de unión al UDP-N-acetilmuramato de ciertas deshidrogenasas (MurB) al extremo N-terminal de la secuencia (Rodríguez-Ruiz *et al.* 2017).

Recientemente se ha descrito cómo la presencia de este dominio de unión del FAD al extremo al N-terminal es una característica compartida con otras aldonolactonas oxidoreductasas de diferentes plantas (Aboobucker & Lorence 2016). Esta peculiaridad en la estructura de la GalLDH le permitiría una mejor interacción con el citocromo *c*, en el proceso de donación de electrones desde la galactono-1,4-lactona, una vez que se ha demostrado de forma fehaciente que el citocromo *c* oxidado es el aceptor de electrones resultantes de la actividad GalLDH (Millar *et al.* 2003; Bartoli *et al.* 2006; Aboobucker & Lorence 2016; Bartoli *et al.* 2016)

Dentro de las enzimas involucradas en el catabolismo de ascorbato se encuentra la **ascorbato peroxidasa** (APX). La APX es una enzima hemínica que lleva a cabo la primera reacción del ciclo ascorbato – glutatión y pertenece a una familia de isoenzimas cuyo número y distribución varía en función de la especie vegetal. A nivel subcelular, en plantas superiores, la APX ha sido descrita en el citosol, cloroplastos (estroma y tilacoides), mitocondrias y peroxisomas (Bunkelmann & Trelease 1996; Shigeoka *et al.* 2002; del Río *et al.* 2003; Palma *et al.* 2013; López-Huertas & del Río 2014). Esta variabilidad se ve reflejada en su estabilidad, su afinidad por el sustrato o en el tamaño molecular de las isoformas. De hecho, se ha descrito que el tamaño varía en función de la localización subcelular, habiéndose descrito isoformas de APX con tamaños moleculares que oscilan entre 28-37,5 kDa (Chen & Asada 1989; Ishikawa *et al.* 1996; De Leonardis *et al.* 2000; Madhusudhan *et al.* 2003). Por otro lado, la localización subcelular de esta enzima está determinada por la presencia de péptidos señal o dominios transmembrana en las regiones N-terminal (cloroplastos y mitocondrias) y C-terminal (peroxisomas) de la proteína (Anjum *et al.* 2016).

La APX es una enzima que usualmente se ha considerado parte de los sistemas antioxidantes de la planta que participan en las respuestas a situaciones de estrés. Así, esta proteína ha estado asociada a procesos relacionados con estrés fotooxidativo o de alta temperatura, aunque también se ha descrito su relevancia frente a procesos de estrés abiótico mediados por metales pesados tales como cadmio, plomo, mercurio, etc. o

metaloides como el arsénico (Karpinski *et al.* 1997; Yabuta *et al.* 2002; Ball *et al.* 2004; Kangasjarvi *et al.* 2008; Koussevitzky *et al.* 2008; Palma *et al.* 2013).

Ya que el pimiento es considerado una de las fuentes de origen vegetal más ricas en vitamina C en nuestra dieta y que el ascorbato juega un papel esencial en la fisiología de los frutos, se hacen imprescindibles y merecen especial atención las investigaciones relacionadas con la modulación de este antioxidante en cultivos de interés agronómico como el pimiento. Teniendo en cuenta la relevancia tanto de la GalLDH como de la APX en el metabolismo de dicho antioxidante se ha llevado a cabo un estudio inmunológico, así como un perfil metabólico de la biosíntesis y degradación de ascorbato en base a las rutas descritas en las figuras 10 y 12 referidas en la Introducción de esta Tesis Doctoral.

En esta Tesis Doctoral se ha abordado también el estudio de la potencial modulación que tiene el metabolismo del ascorbato por RNS, llevándose a cabo estudios *in vitro* de nitración y nitrosilación tanto de la GalLDH como de la APX. Finalmente, se incluyen también estudios preliminares sobre las rutas de síntesis y degradación del ascorbato, en los que se han analizado algunos metabolitos que han sido descritos en otras especies vegetales. El capítulo se completa con los resultados obtenidos en una serie de metabolitos que podrían ser de interés en la fisiología del fruto de pimiento al formar parte de rutas reguladoras en el metabolismo vegetal.

3.2. RESULTADOS/ RESULTS

Continuando con los trabajos realizados hasta ahora en nuestro grupo de investigación, en los cuales se ha llevado a cabo la caracterización molecular de la enzima GalLDH (Rodríguez-Ruiz *et al.* 2017), y viendo el papel fundamental que ejerce esta enzima en la biosíntesis de ascorbato, en esta Tesis Doctoral se ha completado la caracterización de la GalLDH, y se ha investigado la potencial modulación de la misma, así como de otras enzimas implicadas en las vías catabólicas como las responsables del ciclo ascorbato glutatión, más concretamente la APX.

Como paso previo a dichos estudios se analizó el perfil de la GalLDH, así como del contenido de ascorbato en los frutos de pimiento y su evolución durante la maduración, analizándose dichos parámetros tanto en los frutos verdes como en los

rojos. La Fig. 3.2a representa los valores de actividad GalLDH obtenidos en frutos de pimiento, observándose cómo en frutos rojos la actividad era ligeramente mayor que en verdes, si bien no existían diferencias significativas entre ambos frutos (t -Student test $p < 0,05$). La misma tendencia se observó en los contenidos de ascorbato donde se obtenían mayores valores en frutos rojos frente a frutos verdes, pero sin ser diferencias significativas (Fig. 3.2b). Se determinaron, igualmente, los contenidos de glutatión reducido y oxidado, no observándose tampoco diferencias significativas en dichos parámetros a lo largo de la maduración.

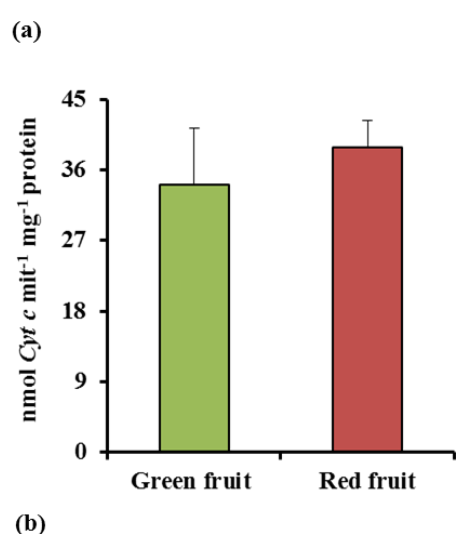


Figure 3.2. L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase activity and ascorbate content in pepper fruits at two ripening stages. (a) GalLDH activity. **(b)** Total ascorbate content, reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG) and GSH/GSSG ratio in cultivar California of pepper fruits. Values represent means of three independent experiments \pm SEM. Student's t -test was applied for comparison between green and red fruits, and no significant differences were observed.

	Ascorbate (mg/100g FW)	GSH (mg/100g FW)	GSSG (mg/100g FW)	GSH/GSSG
California (Green fruits)	141.2 \pm 29.65	3.10 \pm 0.170	1.33 \pm 0.348	5.08 \pm 1.370
California (Red fruits)	153.3 \pm 6.31	2.87 \pm 0.014	0.87 \pm 0.203	3.36 \pm 0.333

3.2.1 Caracterización molecular e inmunológica de GalLDH en frutos de pimiento

En base a los datos de la secuencia nucleotídica de la GalLDH de frutos de pimiento, y las descritas en otras especies vegetales (Rodríguez-Ruiz *et al.* 2017), se elaboró un árbol filogenético de GalLDHs pertenecientes a plantas superiores, con el fin de

establecer correlaciones entre ellas. La Fig. 3.3 muestra que los genes de las GalLDHs más cercanos a la de pimienta fueron los de la familia de las solanáceas *Solanum* y *Nicotiana*, fundamentalmente.

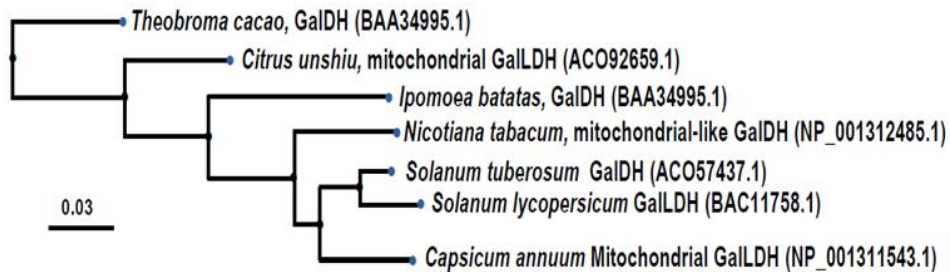


Figure 3.3. Phylogenetic tree of the different higher plant L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) proteins. The branch lengths are proportional to the number of substitutions per site according to the scale depicted.

En este trabajo se procedió también a la generación de un anticuerpo frente a la GalLDH de frutos de pimienta. Para ello, se utilizó el servicio de producción de anticuerpos policlonales de Sigma-Genosys. Se sintetizó un péptido de 15 aminoácidos de la GalLDH de pimienta a partir de una secuencia interna consenso (AY547352) presente también en las otras especies relacionadas taxonómicamente fundamentalmente de los géneros *Solanum* y *Nicotiana*. El péptido obtenido fue DIKKNHKKFLSEKHKH y corresponde a los residuos entre el Asp262 y la His276. El péptido es hidrofílico y contiene una estructura en β . El péptido seleccionado se conjugó con una proteína portadora (*Keyhole Limpet Hemocyanin*, KLH) vía el grupo tiol del residuo de cisteína añadido al extremo carboxílico del péptido seleccionado, usando para ello el reactivo MBS (maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester). De este modo, se usó la construcción DIKKNHKKFLSEKHKH-[C]-KLH para la inmunización de dos conejos mediante el protocolo de 6 inmunizaciones por conejo (Sigma-Genosys, Cambridge, UK) que se muestra en la Tabla 3.1.

Day	Procedure
Antisera Day 0	Pre-Bleed, Inject in CFA
Antisera Day 14	Inject-IFA
Antisera Day 28	Inject-IFA
Antisera Day 35	Bleed
Antisera Day 42	Inject-IFA
Antisera Day 49	Bleed
Antisera Day 56	Inject-IFA
Antisera Day 63	Bleed
Antisera Day 70	Inject
Antisera Day 77	Bleed (Harvest)

Table 3.1. Immunisation and bleed protocol for the production of an antibody against pepper GalLDH.

The service of polyclonal antibody production from a selected peptide of Sigma-Genosys (Cambridge, UK) was used to obtain the antibody. CFA, Complete Freund's adjuvant; IFA, Incomplete Freund's adjuvant.

Tras la obtención de este anticuerpo policlonal, se realizó una purificación por afinidad del mismo, tal y como se describe en el apartado 15 de Material y Métodos de esta tesis. Los análisis realizados por EGPA-SDS de los extractos de pimiento con el anticuerpo frente a la GalLDH mostraron una sola banda inmunoreactiva con un tamaño de 56 kDa, tanto en fruto verde como en rojo (Fig. 3.4a). Para comprobar el efecto de la posible interacción del anticuerpo con la actividad de la enzima, se realizó un ensayo de la misma frente a concentraciones crecientes de anticuerpo. Tal y como se aprecia en la Fig. 3.4b, la actividad enzimática disminuía a medida que aumentaba la concentración de anticuerpo.

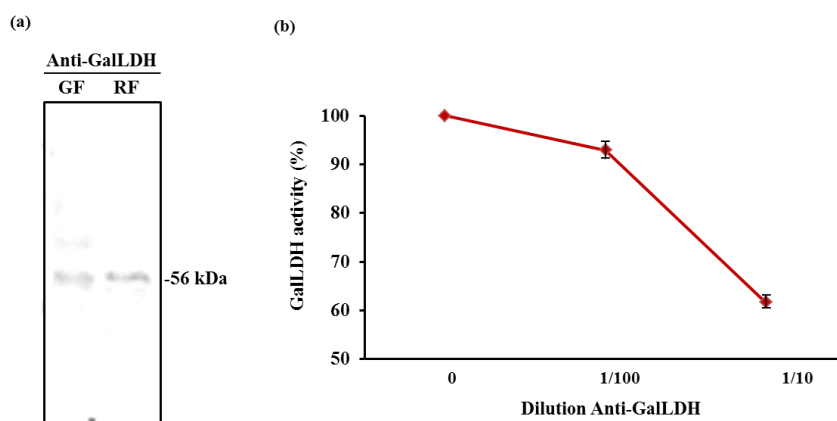


Figure 3.4. Immunological characterization of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase from pepper fruits. (a) Western blotting was assayed using an antibody raised against an internal consensed sequence of GalLDH consisting in 15 amino acids. Samples (15µg/lane) from green fruit (GF) and red fruits (RF) were analysed. (b) GalLDH activity assayed in crude extracts from red fruits in the presence of different antibody dilutions. Activity was expressed as percentage ± SEM of the activity measured in the absence of antibody (100%) after three independent determinations.

❖ Modulación de la GalLDH de frutos de pimiento por RNS

En trabajos recientes se ha descrito que en pimientos expuestos a atmósferas enriquecidas con NO se producía un retraso en el proceso de maduración, y esto podría ir acompañado de modificaciones en el metabolismo de algunos antioxidantes (Chaki *et al.* 2015). Durante esta Tesis Doctoral se estudiaron los niveles de ascorbato en frutos de pimiento expuestos a atmósferas enriquecidas con NO (5 ppm). Tal y como se aprecia en la figura Fig. 3.5a, el contenido de ascorbato aumentaba significativamente ($p < 0.05$) por el tratamiento con NO alrededor de un 42%. Dicho patrón era, por lo general, similar al seguido por la actividad enzimática de la GalLDH. En los pimientos tratados con NO, la actividad GalLDH aumentaba significativamente respecto a los no tratados, siendo este incremento de casi tres veces más respecto al control (Fig. 3.5b). Estos datos se correlacionaban con los obtenidos en los ensayos de PCR cuantitativa donde se comprobó cómo la expresión del gen de la *GalLDH* aumentaba de forma significativa en aquellos pimientos en los cuales se había realizado la incubación con NO, destacando aquellos almacenados durante una semana a temperatura ambiente, tal y como muestran los resultados de la Fig. 3.5c.

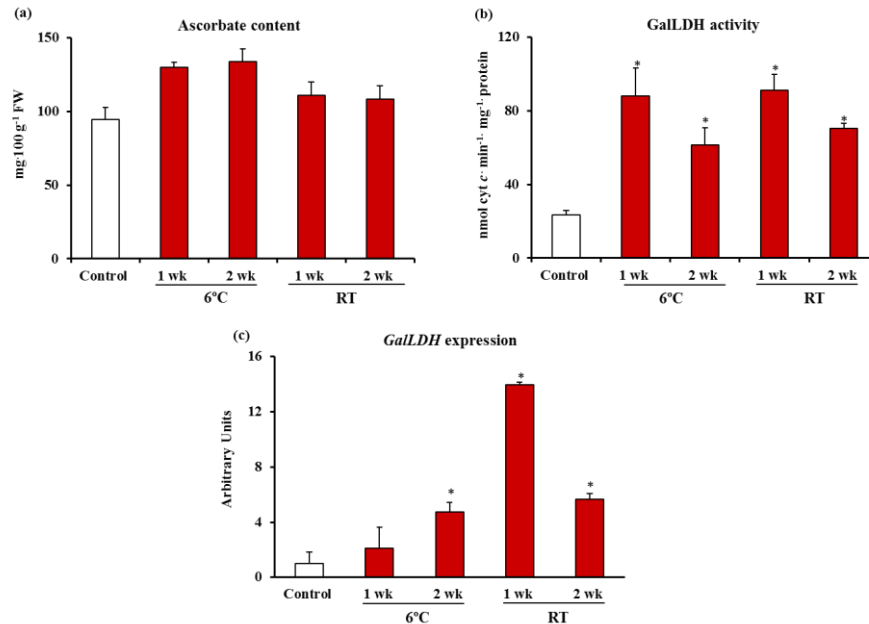


Figure 3.5. Effect of the treatment with exogenous NO gas on the ascorbate content and the GalLDH. (a) Ascorbate content. (b) GalLDH enzyme activity. (c) Expression of the *GalLDH* gene by qRT-PCR. Rfruits were subjected to treatment with 5 ppm NO, then maintained at either 6°C or room temperature (RT) for 1-2 weeks, and crude extracts were prepared for analyses. Values represent means of three independent experiments \pm SEM. Differences between untreated (C) and NO-treated (red bars) plants were statistically significant ($p < 0.05$), where indicated by asterisks.

La maduración de los frutos de pimiento es un proceso caracterizado por un aumento en los niveles de proteínas nitradas. Dicho evento era revertido al exponer a los pimientos a atmósferas enriquecidas con NO. Esta modificación post-traducciona, mediada por RNS, que tiene lugar durante la maduración, es posiblemente la responsable de la disminución de la actividad catalasa encontrada en frutos rojos (Chaki *et al.* 2015). Con el fin de ahondar en el papel de las RNS y su efecto modulador, se llevó a cabo el análisis de la actividad GalLDH de frutos de pimiento en presencia de diferentes fuentes de RNS.

La incubación de extractos de pimiento rojo con concentraciones crecientes de SIN-1 (donador de peroxinitrito) no modificó la actividad enzimática de la GalLDH de forma significativa (Fig. 3.6a). De la misma forma, se realizaron incubaciones de extractos de pimiento rojo con *S*-nitrosoglutatión (GSNO, donador de NO), y tal como muestra la Fig. 3.6b la actividad tampoco se veía modificada significativamente. Sin embargo, al realizar la incubación con glutatión reducido (GSH), la actividad se inhibía un 60% en las dos concentraciones de reactivo empleadas (Fig. 3.6c).

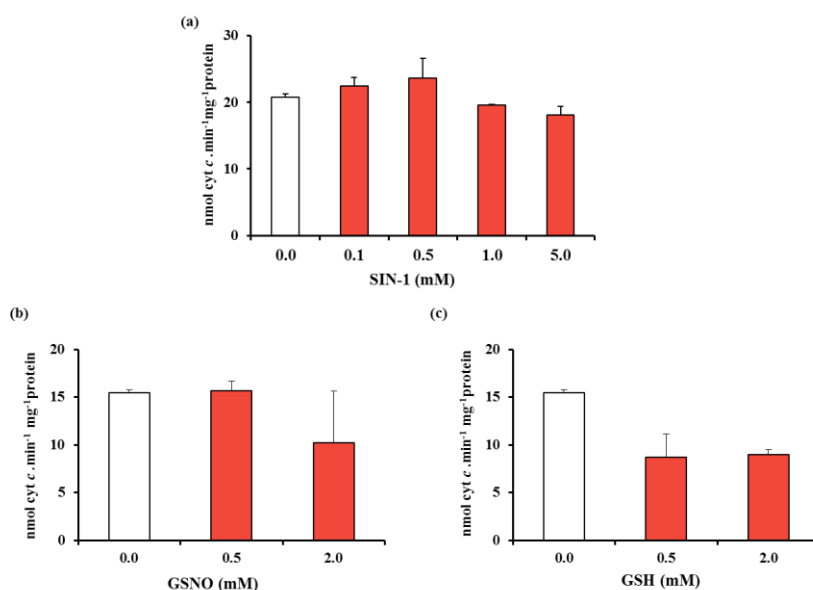


Figure 3.6. *In vitro* assays of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase activity from pepper fruits under nitration and nitrosylation conditions. GalLDH activity was assayed in the presence of different concentrations of (a) 3-morpholino-sydnonimine (SIN-1, a peroxynitrite donor), (b) *S*-nitrosoglutathione (GSNO, an NO donor) and (c) reduced glutathione (GSH). Values represent means of three independent experiments ± SEM. Differences among samples treated with SIN-1 and GSNO were not statistically significant. Treatment of samples with GSH ≥ 0.5 mM provoked significant activity decreases (Student's *t* test, $P \leq 0.005$; $n=3$).

Tras los ensayos realizados *in vitro* se llevó a cabo un análisis *in silico*, con el fin de identificar las tirosinas y las cisteínas susceptibles de sufrir modificaciones post-traduccionales (nitración y *S*-nitrosilación) dentro de la secuencia anteriormente descrita para la GalLDH (Rodríguez-Ruiz *et al.* 2017). La tabla 3.2 muestra la posible posición de las tirosinas y cisteínas con probabilidad de sufrir estas PTMs, deducido en base a los programas GPS-YNO2 1.0 y GPS-SON 1.0.

Table 3.2. Analysis *in silico* of the GalLDH sequence with GPS-YNO2 1.0 and GPS-SNO 1.0 programs to deduce aminoacids (Tyr and Cys) which might be potentially modified by either nitration or *S*-nitrosylation.

SEQUENCE	PUTATIVE CANDIDATE FOR NITRATION AND S-NITROSYLATION			
	Tyr (Y)		Cys (C)	
	Position	Peptide	Position	Peptide
GalLDH (586 aa)	512	ITEEFFHYRHMTQAQ	312	DAVVVVTCNPVSKLR
	558	KKFPVDAYNQARNEL	416	DEILGFDCGGHQWVS

❖ **Modulación de la actividad GalLDH de frutos de pimiento por agentes reductores y oxidantes**

Se realizaron ensayos *in vitro* en los que se analizó el efecto de diferentes moduladores, tanto oxidantes como reductores sobre la actividad enzimática de la GalLDH en frutos de pimiento rojo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 3.7. Las incubaciones realizadas con DTT mostraban una inhibición significativa de la actividad (27%) solamente a concentraciones elevadas (5 mM) (Fig. 3.7a). Sin embargo, los ensayos realizados con *N*-etil-maleimida (NEM) mostraban una inhibición progresiva de la enzima a medida que aumentaba la concentración de este compuesto, viéndose claramente afectada la actividad a concentraciones de 1 y 5 mM con disminuciones del 27,3% y 37,4%, respectivamente (Fig. 3.7b). Las medidas realizadas en las muestras incubadas con H₂O₂ no presentaban cambios significativos en la mayoría de las condiciones, a excepción de la incubación realizada con 1 mM, donde se veía un aumento significativo de aproximadamente un 37% respecto al control (Fig. 3.7c).

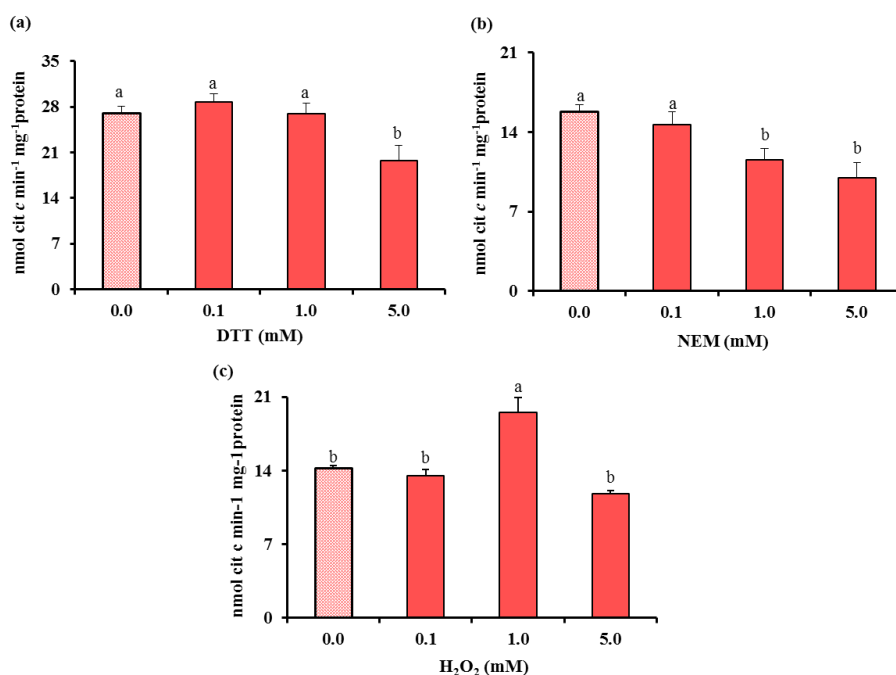


Figure 3.7. *In vitro* assays of galactono-1,4-lactone dehydrogenase activity from pepper fruits with reducing and oxidant agents. GalLDH activity was assayed in the presence of different concentrations of (a) dithiothreitol (DTT), (b) *N*-ethylmaleimide (NEM), and (c) peroxide hydrogen (H₂O₂). Values represent means of three independent experiments ± SEM. Column values with distinct letter are significantly different (ANOVA test, $p < 0.05$).

3.2.2. Enzimas del ciclo ascorbato-glutatión: maduración y modulación por RNS

❖ Maduración de frutos

Continuando con el análisis del metabolismo del ascorbato durante la maduración en frutos de pimiento, se determinó la actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa (APX), primera enzima del ciclo ascorbato-glutatión encargada de eliminar peróxido de hidrogeno mediante la oxidación de ascorbato. Los datos obtenidos para frutos de pimiento verde y rojo se muestran en la Fig. 3.8.

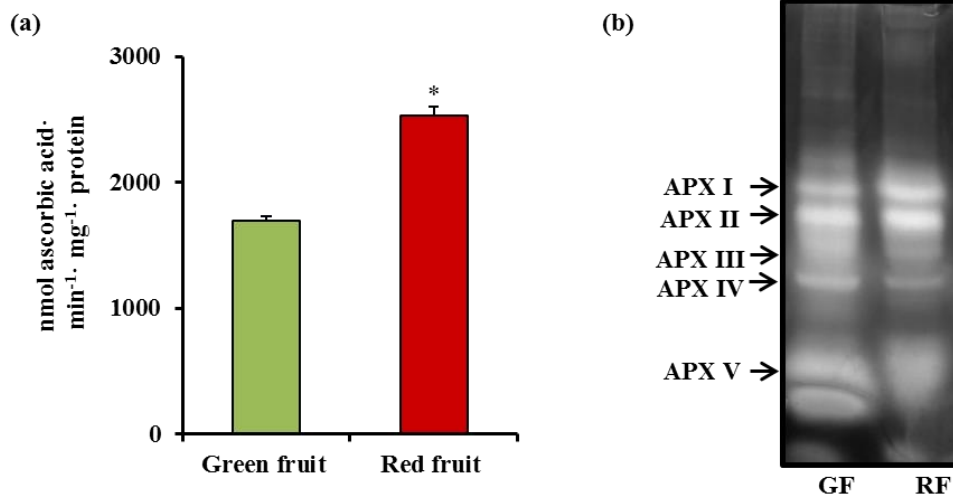


Figure 3.8. Ascorbate peroxidase (APX) activity in sweet pepper fruits. (a) Spectrophotometric assay of APX activity from green and red fruits. (b) Native polyacrylamide gel electrophoresis of green and red fruits stained for APX activity. Values are means of at least three independent experiments.*Differences were significant (Student's *t*-test).GF: green fruit, RF: red fruit.

Los datos obtenidos en el ensayo espectrofotométrico (Fig. 3.8a) mostraban un aumento significativo (*t*-Student, $p < 0.05$) de un 49% en la actividad en frutos rojos respecto a los frutos verdes. La misma tendencia se observaba al analizar la actividad mediante geles nativos. La Fig. 3.8b muestra la actividad APX tras EGPA nativa para muestras de pimiento verde y rojo. En dicha figura se aprecian 5 isoenzimas, denominadas APX I, APX II, APX III, APX IV y APX V en base a su movilidad electroforética creciente. Los geles mostraban mayor intensidad en las isoenzimas APX I-APX III correspondientes a las muestras de frutos rojos, mientras que la APX IV y V fueron mayores en los frutos verdes.

Las actividades del resto de componentes enzimáticos del ciclo ascorbato-glutación, que incluyen la monodeshidroascorbato reductasa (MDAR), la deshidroascorbato reductasa (DAR) y la glutatión reductasa (GR) fueron analizadas tanto en frutos inmaduros (verdes) como en frutos maduros (rojos) (Fig. 3.9). Tanto la actividad MDAR como la GR fueron superiores en pimientos rojos en comparación con los verdes, produciéndose incrementos significativos del 39% y del 38% respectivamente (Fig. 3.9a y c). Sin embargo, la DAR presentaba un comportamiento distinto, disminuyendo ligeramente, aunque de forma significativa en los pimientos maduros rojos frente a los inmaduros verdes (Fig. 3.9b).

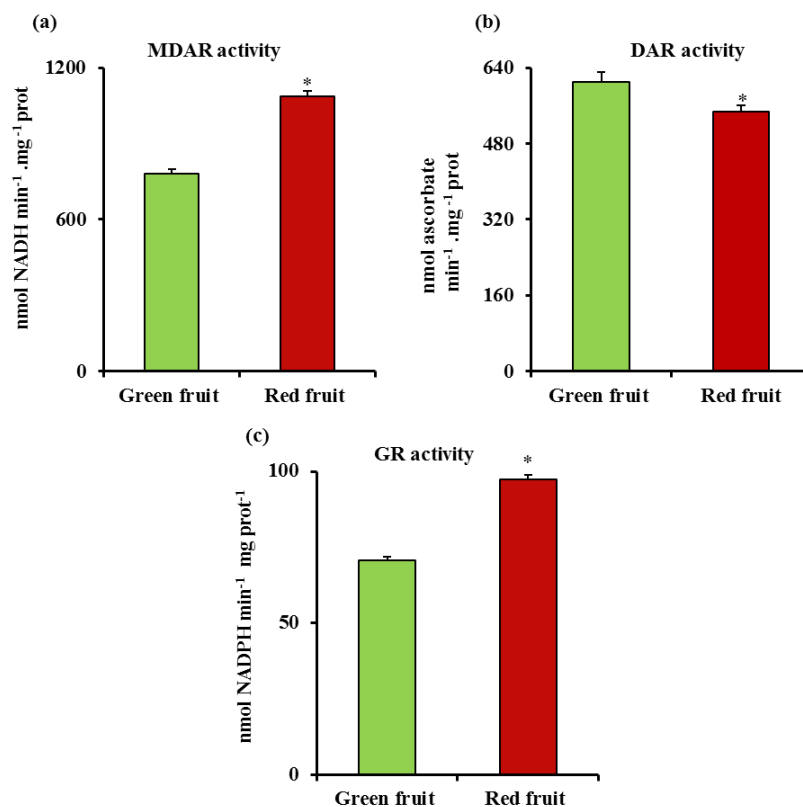


Figure 3.9. Activity of the ascorbate-glutathione cycle enzymes in pepper fruits during ripening. (a) Monodehydroascorbate reductase activity (b) Dehydroascorbate reductase activity (c) Glutathione reductase activity. Values are means \pm SEM of at least of three independent experiments. (*) asterisks denote differences significant by Student's *t* test analysis $p < 0.05$.

❖ Efecto del óxido nítrico *in vivo* en las enzimas del ciclo ascorbato-glutación

Para estos ensayos se siguió el diseño experimental mostrado anteriormente en el Capítulo 1, referido a la acción del NO sobre las peroxidasas de pimienta.

El análisis de la actividad APX en los frutos tratados con atmósferas enriquecidas en NO mostraba un ligero incremento frente a los que no habían sido tratados, destacando sobre todo aquellos que se habían almacenado durante dos semanas a 6°C en los que el incremento era de un 37% con respecto a las condiciones control (Figura 3.10). Sin embargo, en el resto de las condiciones analizadas estas diferencias no eran estadísticamente significativas (ANOVA $p > 0.05$).

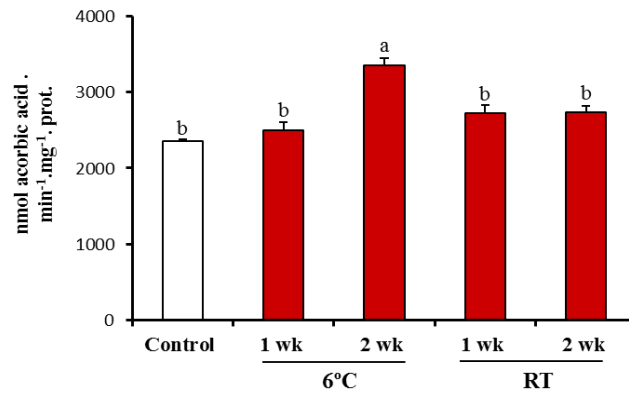


Figure 3.10. Effect of exogenous NO gas treatment on APX activity of sweet pepper fruits. APX enzyme activity was analysed espectrophotometrically. Crude extracts from fruits subjected to NO treatment were prepared for analyses. Values represent means of three independent experiments \pm SEM. Column values with distinct letters are significantly different (ANOVA test $p < 0.05$).

Asimismo, se determinaron las actividades GR y DAR en aquellos pimientos sometidos a atmósferas enriquecidas en NO (5 ppm). La Fig. 3.11 muestra el efecto de dicho tratamiento sobre estas enzimas en las diferentes condiciones de almacenamiento. La actividad DAR aumenta considerablemente en todos los tratamientos a excepción de aquellos pimientos almacenados a baja temperatura durante dos semanas, que no presentan variación respecto al control (Fig. 3.11a). La actividad GR, sin embargo, no se ve afectada de forma significativa en los pimientos tratados, produciéndose una mayor disminución de la actividad ($p < 0,05$) en aquellos pimientos tratados y almacenados a temperatura ambiente durante una semana (Fig, 3.11b, 1 wk, RT).

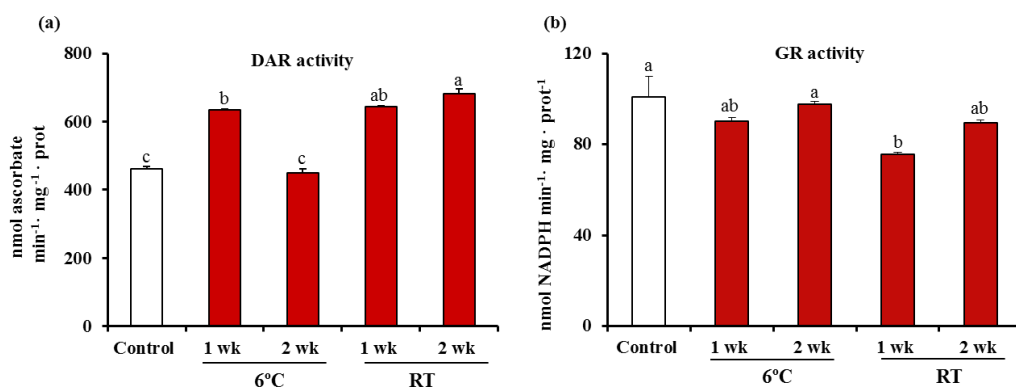


Figure 3.11. Effect of exogenous NO gas treatment on the activity of ascorbate-glutathione cycle enzymes. Spectrophotometric assay of dehydroascorbate reductase activity (a) and glutathione reductase activity (b) in fruits subjected to treatment with NO. Columns with different letters show significant differences with each other by ANOVA analysis. Values are means \pm SEM at least of three independent experiments.

❖ Modulación *in vitro* de la ascorbato peroxidasa por RNS

El análisis del comportamiento de la APX frente a diferentes donadores de NO y ONOO⁻ se muestra en la Fig. 3.12. El tratamiento de extractos de pimiento rojo con concentraciones crecientes de SIN-1 produjo una inhibición progresiva de la actividad enzimática, llegando a una inhibición de prácticamente el 100% en las incubaciones con 5 mM de SIN-1 (Fig. 3.12a). El tratamiento con GSNO presentó unos resultados similares, provocando la inhibición de la actividad enzimática a medida que se aumentaba la concentración del donador, llegando a una inhibición de aproximadamente el 83% en concentraciones de 2 mM de GSNO (Fig. 3.12b). La actividad APX se veía menos afectada con los tratamientos realizados con GSH. Tal y como se aprecia en la Fig. 3.12c, la actividad se veía ligeramente inhibida a medida que aumentaba la concentración de GSH, siendo significativa dicha inhibición a la concentración de 2 mM.

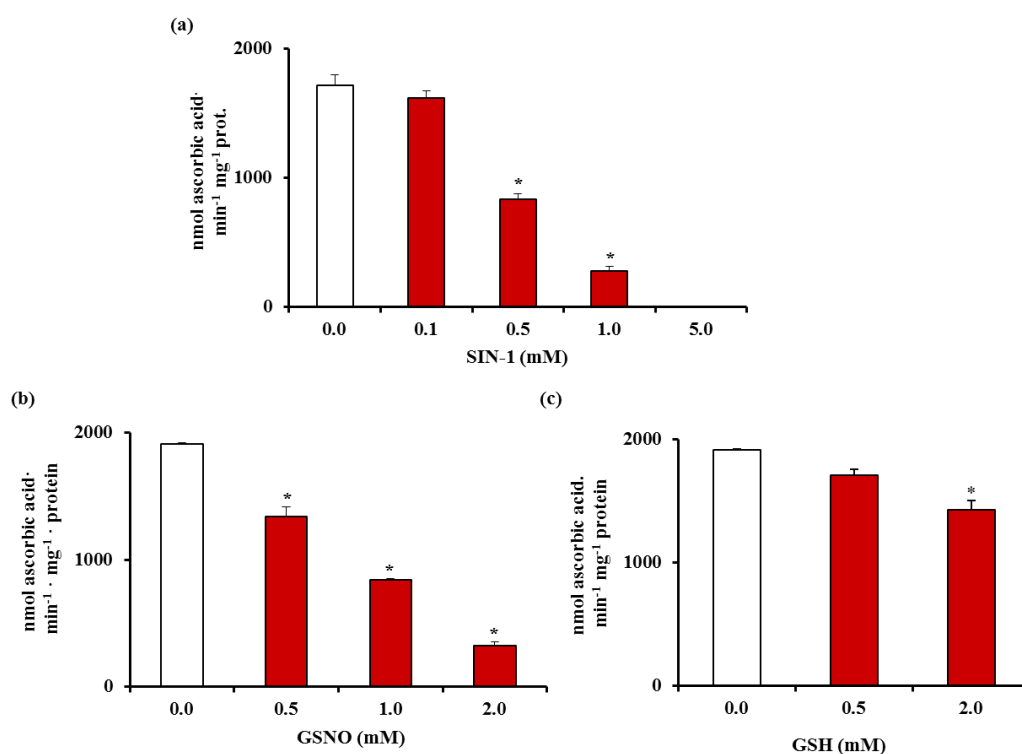


Figure. 3.12. *In vitro* assays of ascorbate peroxidase activity from pepper fruits under nitration and nitrosylation conditions. APX activity was assayed in the presence of different concentrations of (a) 3-morpholino-sydnonimine (SIN-1, a peroxynitrite donor), (b) S-nitrosoglutathione (GSNO, an NO donor) and (c) reduced glutathione (GSH). Values represent means of three independent experiments \pm SEM. *Differences were significant (ANOVA).

3.2.3 Metabolitos implicados en la síntesis y degradación de ascorbato en frutos de pimiento y otros metabolitos de interés: efecto del NO

Con el fin de evaluar el perfil metabólico durante la maduración de los frutos de pimiento así como en aquellos sometidos a incubaciones con óxido nítrico, se llevó a cabo el análisis de diferentes metabolitos relacionados con la biosíntesis y degradación de ascorbato, junto con el de otros metabolitos implicados en los mecanismos de respuesta y protección antioxidante mediante la técnica que combina la cromatografía de gases con la espectrometría de masas (GC-MS).

En todos los resultados se representa la Abundancia Relativa del Metabolito (RMA, *relative metabolite abundance*), que corresponde a la relación entre el área obtenida para cada metabolito en los respectivos cromatogramas con respecto a los estándares internos, en base al peso fresco del material empleado para los análisis. Aquellos resultados en los cuales se realizó un análisis cuantitativo, los valores representados se expresaron como mg del metabolito / gramos de peso fresco de fruto.

❖ **Metabolitos de síntesis de ascorbato.**

Uno de los azúcares estudiados que está muy relacionado con la biosíntesis de ascorbato es la **galactosa**. La Fig. 3.13a muestra que, durante la maduración, la galactosa se incrementaba en 27% respecto al pimiento verde. Por otro lado, los análisis realizados con los pimientos tratados con NO, según el diseño experimental descrito anteriormente, muestran cómo los niveles de galactosa disminuían drásticamente cuando los pimientos eran sometidos al tratamientos con dicho gas y, posteriormente, eran almacenados durante una semana a baja temperatura. Sin embargo, en el resto de condiciones este metabolito no presentaba cambios significativos respecto al control (Fig. 3.13b).

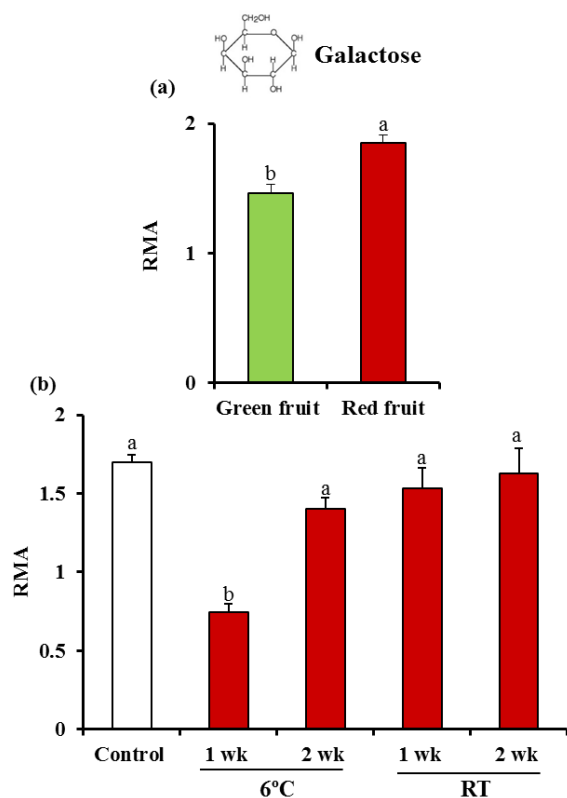
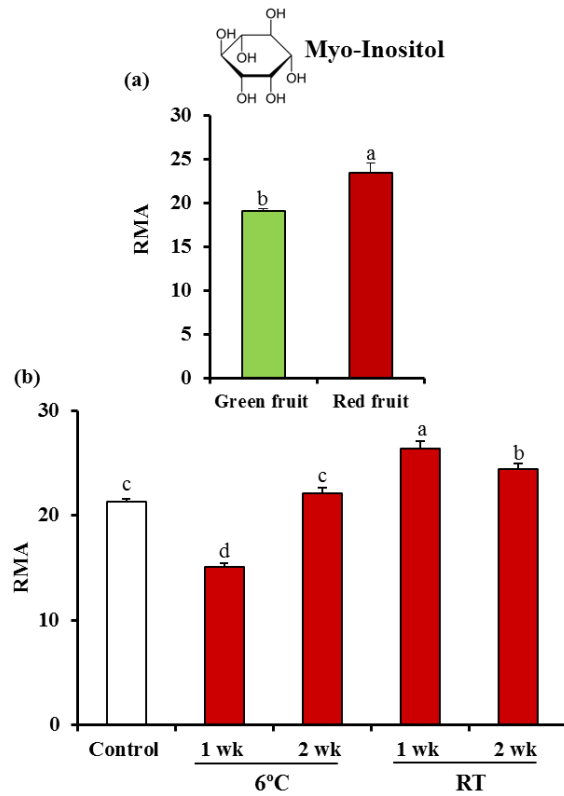


Figure 3.13. Galactose content during pepper fruit ripening and in fruits treated with NO gas. The variations in the content of galactose during pepper ripening (a) and in fruits subjected to NO treatment (b). Galactose content was analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Values are means \pm SEM at least three different experiments. Columns with different letters denote significant differences compared with control samples (ANOVA) ($p < 0.05$). RMA, relative metabolite abundance; wk, week; RT, room temperature.

Otros de los metabolitos analizados durante la maduración y en los pimientos sometidos a tratamiento con NO fue el poli-alcohol **mio-inositol**, ya que es un elemento esencial en una de las rutas de biosíntesis de ascorbato en plantas, según se describió anteriormente. Los resultados mostrados en la Fig. 3.14 representan la abundancia relativa de este metabolito durante la maduración y durante las diferentes condiciones de aquellos pimientos sometidos a tratamiento con NO. Los niveles de mio-inositol aumentaban alrededor del 23% en pimientos rojos respecto a pimiento verdes (Fig. 3.14a), siguiendo la misma tendencia que la galactosa. Cuando se analizaba la modulación de este metabolito en los pimientos tratados con NO, se observaba cómo en aquellos pimientos almacenados a baja temperatura el nivel de mio-inositol disminuía significativamente durante la primera semana, recuperándose los niveles a la segunda semana. Aquellos pimientos tratados y almacenados a temperatura ambiente, veían incrementados los niveles de este metabolito respecto al control tanto a la primera como a la segunda semana (Fig. 3.14b).

Figure 3.14. Myo-inositol content during pepper fruit ripening and in fruits treated with NO gas. The variations in the content of myo-inositol during pepper ripening (a) and in fruits subjected to NO treatment (b). Myo-inositol content was analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Values are means \pm SEM at least three different experiments. Columns with different letters denote significant differences compared with control samples (ANOVA) ($p < 0.05$). RMA, relative metabolite abundance; wk, week; RT, room temperature.



❖ **Metabolitos relacionados con la degradación de ascorbato.**

Entre los metabolitos resultantes de la degradación de ascorbato, según lo descrito en otras especies vegetales, se analizó el contenido del deshidroascorbato (DHA) durante el proceso de la maduración, así como en aquellos pimientos que habían sido incubados con NO (Fig. 3.15). Los datos representados en la Fig. 3.15a muestran la variación del contenido de DHA entre pimiento verde y rojo, donde se aprecia cómo el contenido de DHA aumenta drásticamente alrededor de un 40% durante el proceso de la maduración, alcanzando los niveles superiores en frutos rojos respecto a los frutos verdes (*t* de Student, $p < 0,05$). Este aumento en el contenido de DHA en frutos rojos podría estar relacionado con la disminución observada en la actividad enzimática DAR en estos frutos. El análisis realizado en pimientos sometidos a incubación con NO se muestra en la Fig. 3.15b. En este caso destaca la disminución progresiva en el contenido de deshidroascorbato en aquellos pimientos tratados con NO en comparación de los control, a excepción de los pimientos almacenados a temperatura ambiente durante dos semanas, en los cuales no se mostraban cambios aparentes. La disminución observada en los pimientos tratados fue similar en todos ellos, oscilando esta disminución entre un 27-30% con respecto al control.

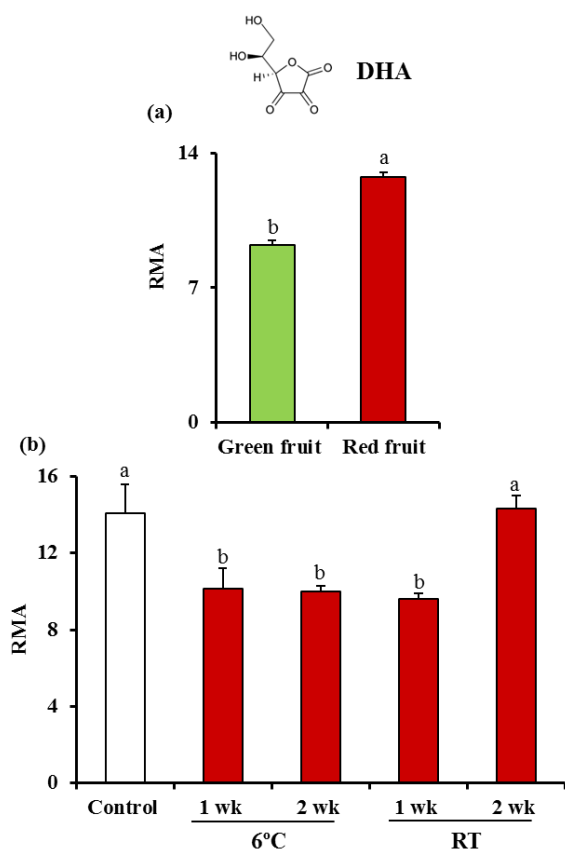


Figure 3.15. Dehydroascorbate (DHA) content during pepper fruit ripening and in fruits treated with NO gas. The variations in the content of DHA during pepper ripening **(a)** and in fruits subjected to treatment **(b)**. DHA content was analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Values are means \pm SEM at least three different experiments. Columns with different letters denote significant differences compared with control samples (ANOVA) ($p < 0.05$). RMA, relative metabolite abundance; wk, week; RT, room temperature.

Otro de los compuestos relacionados en el catabolismo del ascorbato y con naturaleza aminoacídica sobre el que se realizó el análisis del perfil metabólico fue la **treonina**, representado en la Fig. 3.16. Dichos análisis mostraban cómo durante la maduración, el contenido de treonina aumentaba un 35% en pimientos rojos en comparación con los pimientos verdes (Fig. 3.16a). Los resultados obtenidos en los pimientos sometidos a tratamiento con NO sufrían un incremento en todas las condiciones de almacenamiento respecto al control. Así, se aprecia cómo a la semana de tratamiento, tanto a baja temperatura como a temperatura ambiente, el aumento es similar. Sin embargo, en aquellos pimientos almacenados durante dos semanas el incremento de este metabolito era superior en aquellos frutos tratados con NO y almacenados a temperatura ambiente, siendo este incremento de más del doble respecto al control (Fig. 3.16b).

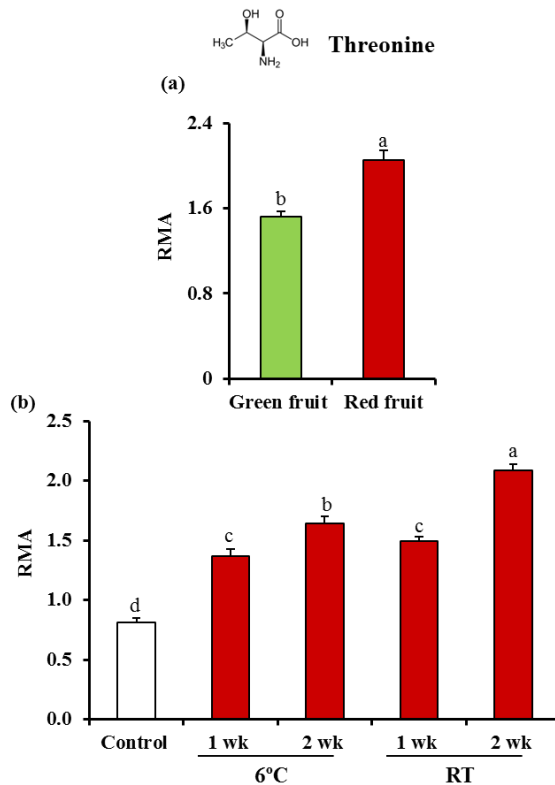


Figure 3.16. Threonine content during pepper fruit ripening and in fruits treated with NO gas. The variations in the content of Threonine during pepper ripening (a) and in fruits subjected to NO treatment (b). Threonine content was analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Values are means \pm SEM of at least three different experiments. Columns with different letters denote significant differences compared with control samples (ANOVA) ($p < 0.05$). RMA, relative metabolite abundance; wk, week; RT, room temperature.

❖ Metabolitos de interés en la maduración de los frutos de pimiento

Durante la puesta a punto del método de detección por GC-MS de los compuestos relacionados con el metabolismo del ascorbato, se acometió a la vez la posibilidad de detectar otros metabolitos de naturaleza glucosídica o aminoacídica que pudieran ser de interés en la fisiología del fruto de pimiento durante la maduración, por las implicaciones reguladoras que tienen. Así, entre los principales azúcares que se investigaron, se analizó el contenido de fructosa, glucosa y sacarosa, como se representa en las Fig. 3.17. Los contenidos tanto de **fructosa** (Fig.3.17a) como de la **glucosa** (Fig. 3.17b) presentaban un patrón similar durante la maduración, siendo los niveles en pimiento rojo superior en más de un 50% a los niveles de pimiento verde. El patrón de ambos azúcares volvía a coincidir en los pimientos tratados con NO. De hecho, en los pimientos sometidos a tratamiento y almacenados a baja temperatura durante una semana (Figs. 3.17c y 17d), disminuía el contenido de los azúcares de forma significativa ($p < 0,05$). Sin embargo, estos niveles se mantenían e incluso aumentaban (20%) en aquellos pimientos sometidos a tratamiento y almacenados durante dos semanas (Figs. 3.17c y 17d), siendo este aumento significativo con respecto a los pimientos control para ambos metabolitos. Por otro lado, la **sacarosa** mostraba un

perfil completamente opuesto (Fig. 3.17e). Mientras que en los pimientos tratados y almacenados a baja temperatura durante la primera semana el contenido de sacarosa aumentaban significativamente (20%), en los pimientos sometidos a las otras condiciones de almacenamiento, el contenido de sacarosa disminuía drásticamente llegando a una reducción de aproximadamente un 67,3% en aquellos frutos almacenados a temperatura ambiente durante dos semanas.

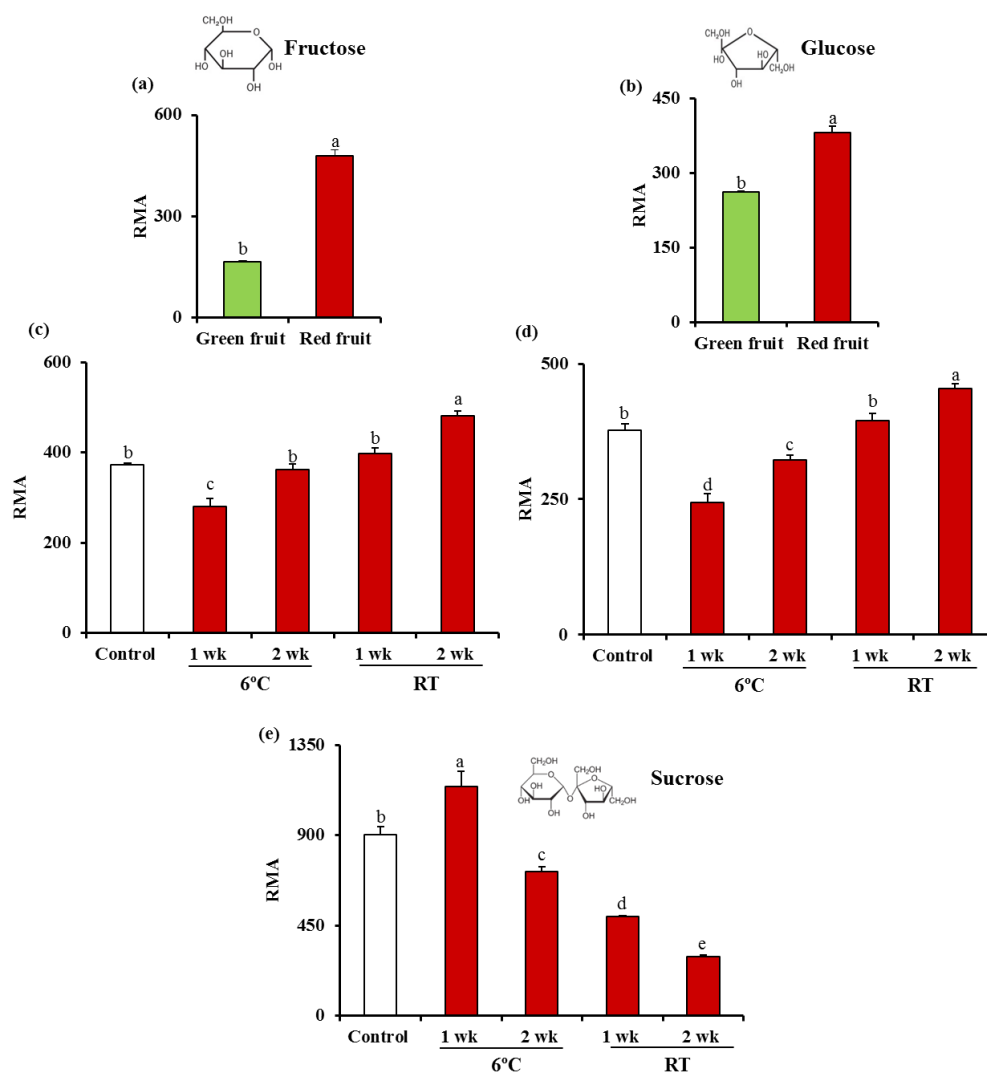


Figure 3.17. Metabolism of sugars during ripening of fruits and in samples treated with NO gas. Relative sugars abundance during pepper ripening (a, b) and in fruits subjected to NO treatment (c, d, e) were analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Values are means \pm SEM at least three different experiments. Columns with different letters denote significant differences compared with control samples (ANOVA) ($p < 0.05$). RMA, relative metabolite abundance; wk, week; RT, room temperature.

Asimismo se analizaron otros metabolitos complementarios y que incluían al ácido γ -amino butírico (GABA), la cisteína (Cys), la metionina (Met) y el ácido glutámico (Glu).

El análisis del aminoácido no proteico **GABA** durante la maduración en muestras de pimiento verde y rojo mostró cómo los niveles de este aminoácido disminuían un 31% durante la maduración (Fig. 3.18a). Teniendo en cuenta la importancia de dicho aminoácido en los mecanismos de respuesta a estrés, se realizó un análisis cuantitativo de este metabolito en los pimientos que habían sido sometidos a tratamiento con NO. La Fig. 3.18b muestra los resultados obtenidos para el GABA durante dicho tratamiento. Tal y como se aprecia en la gráfica, estos valores aumentaban considerablemente respecto al control en todas las condiciones del tratamiento, destacando, los valores obtenidos en los frutos sometidos a tratamiento y almacenados durante dos semanas, donde el incremento del GABA con respecto al control era de casi 3 veces más.

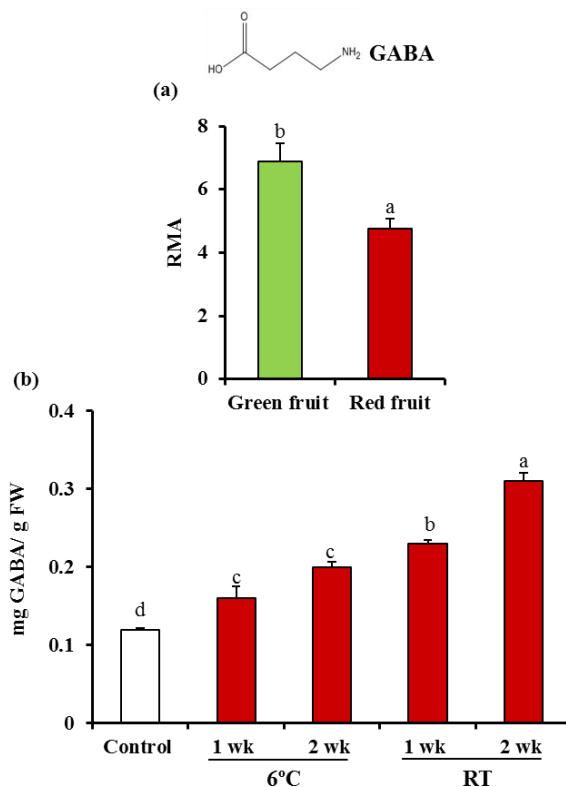


Figure 3.18. Relative GABA content during pepper fruit ripening and GABA concentration (mg/g FW) in fruits treated with NO gas. Panel (a) depicts the variations in the relative GABA content during ripening. The concentration determined for this amino acid is shown in panel (b), where fruits were subjected to treatment with NO. GABA content was analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Values are means \pm SEM at least three different experiments. Columns with different letters denote significant differences compared with control samples (ANOVA) ($p < 0.05$). RMA, relative metabolite abundance; wk, week; RT, room temperature.

Otro de los aminoácidos seleccionados para su análisis fue el **ácido glutámico**: Los resultados obtenidos en frutos de pimiento se muestran en la Fig. 3.19. La abundancia relativa de este metabolito era dos veces inferior en pimientos rojos (46,7%) que en verdes (Fig. 3.19a). Por otro lado, los análisis realizados en los pimientos tratados con NO mostraban un incremento de ácido glutámico en todas las condiciones respecto al control, produciéndose incrementos de casi el doble en la mayoría de los casos (Fig. 3.19b).

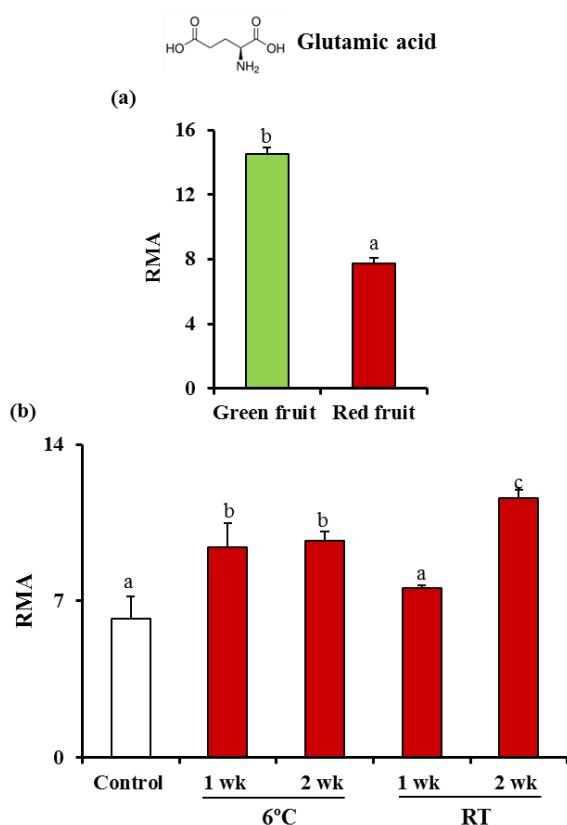


Figure 3.19. Glutamic acid content during pepper fruit ripening and in fruits treated with NO gas. The variations in the levels of glutamic acid during pepper ripening (a) and in fruits subjected to treatment (b). Glutamic acid content was analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Values are means \pm SEM at least three different experiments. Columns with different letters denote significant differences compared with control samples (ANOVA) ($p < 0.05$). RMA, relative metabolite abundance; wk, week; RT, room temperature.

Otro de los aminoácidos esenciales analizados durante el tratamiento de los pimientos con NO fue la **metionina** (Met). La Figura 3.20 muestra que los niveles de Met aumentan gradualmente con los tratamientos, produciéndose un incremento drástico y significativo ($p < 0,05$) de casi 10 veces más en los pimientos tratados con NO y almacenados durante dos semanas a temperatura ambiente.

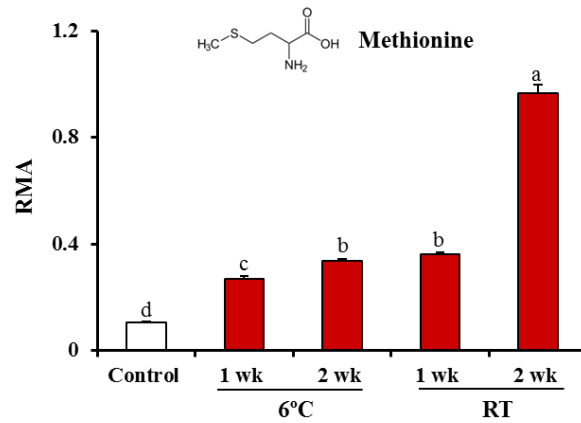


Figure 3.20. Relative methionine content in fruits subjected to treatment with NO gas. Methionine variations between treatment conditions were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Values are means \pm SEM at least three different experiments. Columns with different letters denote significant differences compared with control samples (ANOVA) ($p < 0.05$). RMA, relative metabolite abundance; wk, week; RT, room temperature.

Por último, se estudiaron los niveles de **cisteína** (Cys), realizándose un análisis cuantitativo de la misma durante las distintas condiciones ensayadas. En la Fig. 3.21 se observa que el contenido de cisteína era relativamente bajo en las condiciones iniciales (Control), sin producirse variaciones durante la primera semana en ninguna de las dos condiciones de almacenamiento tras la incubación con NO. Sin embargo, a las dos semanas de almacenamiento, tanto a baja temperatura como a temperatura ambiente, se producían incrementos drásticos del 4 veces más y 30 veces respectivamente.

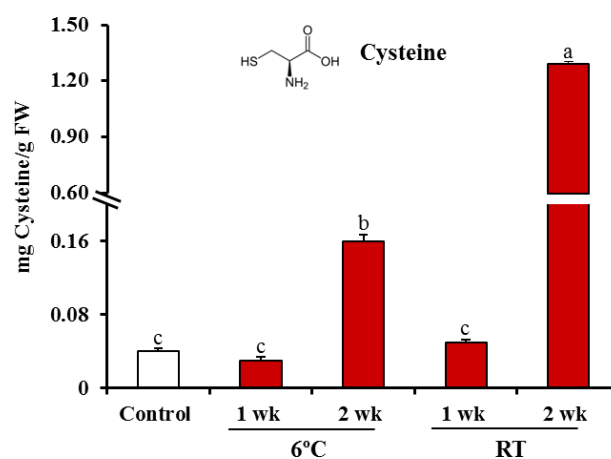


Figure 3.21. Cysteine content in fruits subjected to treatment with NO gas. Cysteine variations between treatment conditions were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Values are means \pm SEM at least three different experiments. Columns with different letters denote significant differences compared with control samples (ANOVA) ($p < 0.05$). RMA, relative metabolite abundance; wk, week; RT, room temperature.

3.3 DISCUSIÓN/ DISCUSSION

Debido a la importancia de la GalLDH en la biosíntesis de ascorbato, durante este trabajo se ha completado la caracterización bioquímica y molecular que ya se inició anteriormente, según se describe en un trabajo reciente (Rodríguez-Ruiz *et al.* 2017). Con el fin de obtener una visión global de la regulación de los niveles de ascorbato, también se han analizado algunas enzimas claves del metabolismo de este antioxidante como son las que forman parte del ciclo ascorbato-glutatión, y que incluyen a la APX, la DAR, la MDAR, y la GR. Para ello, se ha estudiado en todas ellas su evolución durante el proceso de maduración y en atmósferas enriquecidas con óxido nítrico (NO).

La secuencia de aminoácidos de la GalLDH mostró altas similitudes con otras GalLDHs descritas anteriormente y pertenecientes a la familia de las Solanáceas, tales como la de tabaco (*N. tabacum*; Yabuta *et al.* 2000) y tomate (*L. esculentum*; Pateraki *et al.* 2004). Este alto grado de similitud en las secuencias entre tomate y pimiento ha permitido que las herramientas moleculares desarrolladas en tomate se puedan aplicar de manera eficiente y fiable para estudiar procesos moleculares que tengan lugar durante la maduración del pimiento (Moore *et al.* 2005; Alós *et al.* 2013).

En la mayoría de los casos descritos la forma monomérica de la GalLDH consiste en una secuencia compuesta de 580-590 aminoácidos (incluyendo el péptido señal mitocondrial), dando lugar a un polipéptido de aproximadamente 56 kDa. Esto se corresponde con el tamaño obtenido en pimiento verde y rojo tras los ensayos por *immunoblot* con el anticuerpo descrito en esta Tesis Doctoral. Las diferencias encontradas entre la expresión del gen y la actividad enzimática de la GalLDH sugieren que esta proteína es una pieza clave en la modulación de la fisiología del pimiento. Además de esta regulación post-transcripcional que tiene lugar en los pimientos tratados con NO según se deduce de la Fig. 3.5 de esta Tesis Doctoral, se ha observado que otro tipo de control tanto a nivel traduccional como post-traduccional puede estar teniendo lugar durante las fases de transición entre la floración y la formación del fruto (Rodríguez-Ruiz *et al.* 2017). Estos autores comprobaron que en la floración aumenta el nivel de transcritos de GalLDH, sin que ello se tradujera en una mayor actividad de la enzima (Fig. 3.22), lo que hacía pensar que estos transcritos podrían expresarse posteriormente en el fruto, donde la GalLDH juega un papel esencial y donde se encargará de la síntesis de ascorbato (Palma *et al.* 2015).

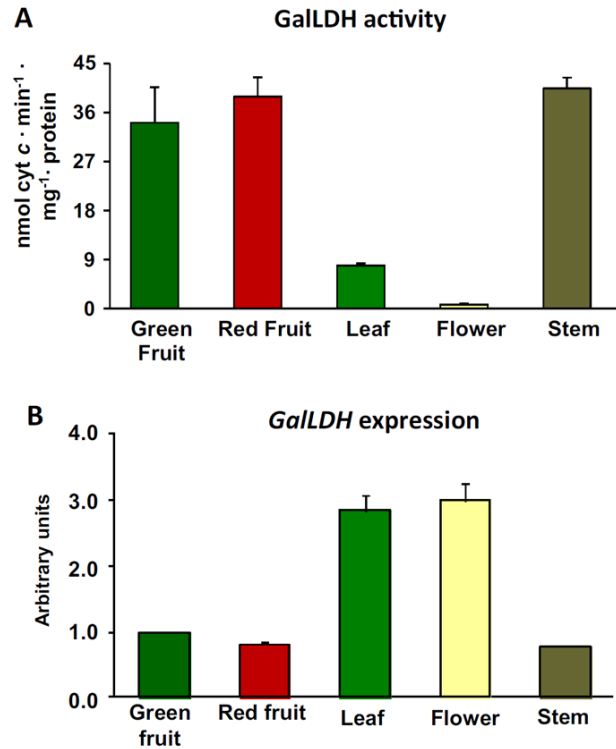


Figure 3.22. Galactono – 1, 4 –lactone dehydrogenase activity and gene expression in different organs of pepper plants. A, GalLDH activity. B, GalLDH gene expression determined by qRT-PCR. Reproduced from Rodríguez- Ruiz *et al.* 2017.

El ascorbato es una molécula de pequeño tamaño y con gran capacidad para transportarse entre tejidos de manera que, a pesar de que los frutos de pimiento tienen la cualidad de sintetizar ascorbato a través de la GalLDH, este antioxidante puede venir suministrado por otras fuentes, como son las hojas y los tallos en los que la actividad de la enzima es alta (Franceschi & Tarlyn 2002; Lorence *et al.* 2004; Tedone *et al.* 2004; Gautier *et al.* 2009; Massot *et al.* 2012; Bartoli *et al.* 2016; Rodríguez-Ruiz *et al.* 2017). Esta capacidad de transporte explicaría el diferente comportamiento encontrado entre los distintos órganos estudiados así como las diferencias observadas en las actividades enzimáticas y la expresión del gen en las plantas de pimiento (Rodríguez-Ruiz *et al.* 2017). La expresión regular del gen durante los procesos de desarrollo y maduración en los frutos de pimiento permitiría la continua renovación de la enzima, ya que, tal y como se especificó anteriormente, esta enzima es muy variable y contribuye tanto al mantenimiento como al incremento de los niveles de ascorbato. Este papel en la regulación de los niveles de ascorbato se ha observado también durante el desarrollo y maduración de frutos en especies como tomate (Badejo *et al.* 2012; Mellidou *et al.*

2012), melón (Pateraki *et al.* 2004), naranja (Yang *et al.* 2011), acerola (do Nascimento *et al.* 2005; Badejo *et al.* 2009) y fresa (do Nascimento *et al.* 2005), entre otras.

En la regulación de los niveles de ascorbato, no sólo la GalLDH es un factor importante, sino que el aporte de moléculas como la GDP-manosa y la L-galactosa-1P, que intervienen en las etapas anteriores de la ruta de biosíntesis, también son consideradas claves en la regulación de ascorbato. En dicho proceso intervienen enzimas como la GDP-D-manosa-pirofosforilasa (GMP, VTC1) o la GDP-L-galactosa fosforilasa (GGP, VTC2), también consideradas de vital importancia en esta ruta biosintética. De hecho, se ha descrito como mutantes de *Arabidopsis* deficientes en estos dos genes (*vtc1* y *vtc2*) no son viables (Conklin *et al.* 1999; Alhag Dow *et al.* 2007; Dowdle *et al.* 2007; Linster & Clarke 2008; Bartoli *et al.* 2016). No obstante, estas vías aún no han sido investigadas en los frutos de pimiento.

Hasta ahora los trabajos relacionados con el efecto del NO sobre el metabolismo antioxidante han sido relativamente escasos en plantas. Por otra parte, la modulación de antioxidantes como el ascorbato provocada por RNS tampoco ha sido muy estudiada, y su abordaje en plantas de interés agronómico ha sido prácticamente nulo. Sin embargo, este tema está despertando la atención en especies como el pimiento, donde el metabolismo de ascorbato es fundamental para la maduración de este fruto (Palma *et al.* 2015), y donde se ha observado que el tratamiento con NO sobre frutos de pimiento provocaba un retraso en la maduración y modulaba la actividad de algunos antioxidantes enzimáticos como es la catalasa (Chaki *et al.* 2015). Dos de las dianas fundamentales para investigar la modulación de ascorbato por RNS, GalLDH y APX, jugando este último un papel fundamental en el mantenimiento del estado redox en las células vegetales (Gallie 2013; Massot *et al.* 2013).

Durante este capítulo se ha abordado y estudiado el efecto de NO sobre los niveles de ascorbato en frutos de pimiento así como el efecto sobre la actividad de las posibles PTMs (nitración y S-nitrosilación) que pueden estar teniendo lugar en enzimas como la GalLDH y la APX. Asimismo, se ha estudiado dicho efecto en el resto de enzimas (MDAR, DAR y GR) del ciclo ascorbato-glutatión.

Nuestros resultados indican que el tratamiento directo de NO sobre frutos de pimiento genera aumentos significativos en los niveles de ascorbato (40%). Estos datos son de gran relevancia, no solo por la importancia de este antioxidante a nivel

metabólico y desde el punto de vista molecular, sino a nivel nutricional, debido a que el pimiento es uno de los frutos más consumidos a nivel mundial. La biosíntesis y los niveles de ascorbato en plantas vienen condicionados por factores como la luz (Smirnoff 2000; Tamaoki *et al.* 2003; Gautier *et al.* 2009; Bartoli *et al.* 2016), y varía durante procesos como el desarrollo, senescencia (Bartoli *et al.* 2000), germinación (Pallanca & Smirnoff 1999), maduración de frutos (Jiménez *et al.* 2002; Agius *et al.* 2003; Pateraki *et al.* 2004; Palma *et al.* 2015; Bartoli *et al.* 2016) y floración (Barth *et al.* 2006), indicando esto, que el estado redox de la célula es fundamental para cada uno de estos procesos (Wolucka & Van Montagu 2003; Mateos *et al.* 2009). Se ha visto que factores como la luz y la temperatura interaccionan modulando los niveles de ascorbato en frutos de tomate, así como de las enzimas implicadas en la biosíntesis y regeneración del mismo (Massot *et al.* 2013). Nuestros resultados ponen de manifiesto que el NO y la temperatura también podrían estar interaccionando, provocando la modulación de este antioxidante en frutos de pimiento. Los procesos de conservación y procesado pueden afectar a los contenidos de ascorbato en frutos (Martinez *et al.* 2005; Melino *et al.* 2009), por lo que el estudio y la mejora de técnicas de post-cosecha es esencial.

Procesos como la respiración celular también pueden controlar la síntesis de ascorbato en plantas, y para una biosíntesis adecuada es preciso que el flujo de electrones a través del complejo I en la cadena respiratoria mitocondrial sea adecuado (Millar *et al.* 2003). Enzimas involucradas en la síntesis de ascorbato en plantas como la GDP-manosa-3,5-epimerasa, son sensibles al estado redox de la célula y son inhibidas por NAD(P)H (Wolucka & Van Montagu 2003). Otras de las enzimas que se ve afectada por el estado redox es la L-galactosa deshidrogenasa (GalDH). En el caso de esta última, se ha comprobado como esta enzima está regulada por la forma reducida del ascorbato y no por su forma oxidada, siendo esto esencial para el correcto funcionamiento de la ruta (Mieda *et al.* 2004). De la misma forma, tal y como sugieren nuestros resultados *in vitro*, los niveles de ascorbato en frutos de pimiento estaban condicionados por el estado redox existente alrededor de esta enzima, ya que esta era inhibida por GSH.

El NO está involucrado en procesos de crecimiento y desarrollo, germinación de semillas, crecimiento de raíces principales y secundarias, senescencia, regulación del crecimiento del tubo polínico, floración, maduración de frutos y respuesta de defensa frente a estreses abióticos y bióticos (Lamattina *et al.* 2003; del Rio *et al.* 2004; Shapiro

2005; Airaki *et al.* 2015). En muchos de estos procesos, donde también influye el ascorbato, el NO y el ascorbato podrían interactuar entre ellos provocando una respuesta de la planta más adecuada. Se ha descrito cómo el NO modula procesos fisiológicos a través de PTMs mediadas por RNS, participando de este modo en eventos de señalización celular. La mayor parte de las PTMs de proteínas mediadas por RNS se produce por la unión a metales, nitrosilación de grupos tioles y nitración de tirosinas u otros aminoácidos (Gow *et al.* 2004). En nuestro modelo, los altos niveles de ascorbato obtenidos en los pimientos tratados con NO parecen estar modulados a nivel transcripcional en vez de a nivel post-traducciona, tal y como muestran los ensayos sobre PTMs mediados por RNS realizados con la GalLDH. Por lo tanto, los valores de expresión y actividad obtenidos para la GalLDH podrían ser los responsables del contenido de ascorbato en los pimientos sometidos a tratamiento aunque no se puede descartar una regulación por parte de la APX. De hecho, los ensayos realizados sobre la APX revelaban cómo la actividad de esta enzima se veía afectada por RNS, como se observó en los ensayos sobre nitración (SIN-1) o S-nitrosilación (GSNO) de la misma. En trabajos recientes, como los de Begara-Morales *et al.* (2014) realizados en guisante, se observó cómo esta enzima está afectada por estas dos modificaciones post-traduccionales. Posteriormente, se observó cómo enzimas involucradas en el ciclo AsA-GSH, como la MDAR también se veía afectada por la nitración y la nitrosilación, detectándose una inactivación de la MDAR, y comprometiendo así la capacidad antioxidante del ciclo. Sin embargo, la actividad glutatión reductasa (GR) no se veía afectada por ninguna de las moléculas derivadas de NO que median estas PTMs (Begara-Morales *et al.* 2015). Investigaciones recientes, en las que se trabaja en líneas de tomate cherry (*Solanum lycopersium* L.) con el gen de la MDAR silenciado, han puesto de manifiesto la importancia de esta enzima en procesos de crecimiento y desarrollo, fotosíntesis y metabolismo de los carbohidratos (Truffault *et al.* 2016). En el caso de la GR, que no se veía modificada por ninguna de las PTMs, podría ser un mecanismo para mantener los niveles de GSH y por tanto del estado redox celular. No obstante, es necesario el estudio de otras enzimas claves en el metabolismo del ascorbato, tal como se ha mencionado anteriormente (GMP, GGP y GalDH) para obtener una visión completa de la modulación de este antioxidante en frutos de pimiento.

Por otro lado, para nuestro conocimiento, en esta Tesis Doctoral se aportan, por primera vez, resultados sobre los niveles de metabolitos implicados en la síntesis y degradación de ascorbato (galactosa, mio-inositol, y treonina, respectivamente) en pimiento, así como de otros metabolitos de interés desde el punto de vista de regulación metabólica (GABA, cisteína, metionina y ácido glutámico). Anteriormente, se han estudiado alguno de estos metabolitos de síntesis y degradación de ascorbato en tomate y se ha analizado su evolución en los frutos tras diversos tratamientos (Gautier *et al.* 2013; Massot *et al.* 2013; Truffault *et al.* 2013,2017). Si bien la ruta de biosíntesis de ascorbato está bien establecida, tanto a nivel de las enzimas participantes, como de los metabolitos que éstas generan, la ruta de degradación está muy poco estudiada, y aún no se sabe con certeza cuáles son las etapas totales que constituyen dicha vía. En pimiento, y dada la relevancia del ascorbato en la fisiología de los frutos, es fundamental llegar a conocer la ruta de degradación completa, ya que de ello va a depender la homeostasis del ascorbato. Esta Tesis Doctoral es por tanto, una contribución pionera al abordaje del catabolismo del ascorbato en los frutos de pimiento.

En relación al resto de metabolitos estudiados, los resultados muestran que estos pueden desempeñar una función importante en la maduración de los frutos de pimiento, así como en la respuesta frente al tratamiento con NO y en las etapas de post-cosecha. No obstante, y dada la escasez de datos a este respecto, sería deseable que nuevas investigaciones abordasen estos estudios.

CAPÍTULO 4

S- NITROSOGLUTATIÓN REDUCTASA (GSNOR) EN FRUTOS DE PIMIENTO

CHAPTER 4

NITROSOGLUTATHIONE REDUCTASE (GSNO) IN PEPPER FRUITS

4.1 INTRODUCCIÓN/ INTRODUCTION

El objetivo de este estudio fue el análisis comparativo de la actividad GSNOR, así como la expresión a nivel de su proteína y del gen, en frutos de pimiento verde y rojo, además de frutos tratados con atmósferas enriquecidas con NO. Asimismo, se analizó el contenido de *S*-nitrosotioles (SNOs) proteicos y, por tanto, de proteínas susceptibles de sufrir posibles cambios post-traduccionales, como la *S*-nitrosilación.

El óxido nítrico (NO), como ya se indicó en la introducción, es un gas, involucrado de forma directa o indirecta en numerosos procesos fisiológicos de las plantas tanto en condiciones ambientales óptimas como en situaciones de estrés (Corpas *et al.* 2011; Domingos *et al.* 2015; Sanz *et al.* 2015). A partir del NO se forman moléculas derivadas como el *S*-nitrosoglutatión (GSNO), peroxinitrito (ONOO⁻), dióxido de nitrógeno (NO₂) o ácido grasos nitrados (NO₂-FA), entre otras, las denominadas especies de nitrógeno reactivo (RNS) (Corpas 2017; Mata-Pérez *et al.* 2017). Por otro lado, el NO participa en procesos de oxidación-reducción los cuales pueden afectar a las vías de transducción de señales donde las RNS juegan un papel fundamental. En muchos casos, la regulación de los procesos fisiológicos tiene lugar a través de modificaciones post-traduccionales (PTMs) en las proteínas, principalmente nitración y *S*-nitrosilación (formalmente designada *S*-nitrosación) (Astier *et al.* 2012b; Corpas *et al.* 2013b; Begara-Morales *et al.* 2016; Zaffagnini *et al.* 2016) que intervienen en los mecanismos de señalización celular (Ischiropoulos & Gow 2005; Corpas & Barroso 2014; Domingos *et al.* 2015).

Casi todos los estudios de nitración de proteínas en plantas se han realizado sobre la nitración de tirosina (Tyr-NO₂), que se produce en uno de los dos carbonos en posición orto de un residuo de dicho aminoácido (Gow *et al.* 2004). Esta modificación puede estar mediada por peroxinitrito, que es generado por la reacción entre dos moléculas radicales, el [•]NO y el radical superóxido (O₂^{•-}), pero también puede estar mediada por la participación de [•]NO₂ producido por la reacción de H₂O₂ y nitrito (NO₂⁻) en presencia de hemoperoxidasas (Souza *et al.*, 2008; Corpas *et al.*, 2013b). La nitración no es un proceso aleatorio ya que depende de ciertos factores como ya se indicó en el apartado 6.4 de la Introducción. La nitración de los residuos de tirosina es considerada un proceso irreversible que generalmente da lugar a la inhibición de la función de la proteína afectada (Radi 2004; Souza *et al.* 2008; Begara-Morales *et al.* 2013; Radi

2013a; Mata-Pérez *et al.* 2017). En la última década, los estudios sobre la nitración de proteínas en plantas han ido aumentando gradualmente y, hasta ahora ha sido aceptado que existe un nivel de nitración endógena que puede tener cierta relevancia, en los procesos que requieran una regulación. No obstante, un aumento en el contenido de proteínas nitradas bajo condiciones de estrés celular podría ser considerado un marcador fidedigno de estrés nitrosativo (Radi 2004; Corpas *et al.* 2007; Corpas *et al.* 2008b; Souza *et al.* 2008; Astier & Lindermayr 2012; Begara-Morales *et al.* 2013; Radi 2013b; Corpas *et al.* 2015), de igual manera que la oxidación de proteínas es considerado como un marcador de estrés oxidativo. Estudios relacionados con esta modificación han demostrado e identificado la presencia de proteínas que sufren nitración de tirosina bajo condiciones fisiológicas en plantas de girasol (*Helianthus annuus*) (Chaki *et al.* 2009b), *Arabidopsis thaliana* (Lozano-Juste *et al.* 2011), o naranjo amargo (*Citrus aurantium*) (Tanou *et al.* 2012). En el caso de semillas de arroz (*Oryza sativa*) y de tabaco (*Nicotiana tabacum*) se observó cómo, en condiciones óptimas, la nitración de la α -tubulina provocaba la inhibición de la división celular y por tanto del crecimiento celular (Jovanovic *et al.* 2010). Otros análisis realizados en diferentes órganos de guisante (*Pisum sativum* L.) durante distintos estadios de desarrollo hasta la senescencia indican que cada órgano presenta un patrón específico de nitración (Begara-Morales *et al.* 2013). En el caso del pimiento (*Capsicum annuum* L.) se ha observado cómo el patrón de proteínas nitradas también cambiaba a lo largo de la maduración, detectándose que el número de proteínas que sufrían esta modificación aumentaba durante dicho proceso (Chaki *et al.* 2015).

La **S-nitrosilación** o S-nitrosación consiste en la unión de NO a un grupo tiol (-SH) de un residuo de las cisteína presentes en proteínas o péptidos (Fig. 4.1). Esta PTM, al ser reversible, es considerada como la que puede tener un mayor repercusión en la señalización mediada por el NO (Corpas *et al.* 2015). Dentro de los residuos de Cys presentes en una proteína, sólo unos pocos son susceptibles de ser diana de la S-nitrosilación. Dicha especificidad puede estar condicionada, entre otros factores, por el medio en el cual se encuentre la proteína, ya sea ácido o básico (Stamler *et al.* 2001; Foster *et al.* 2003; Astier & Lindermayr 2012). Éste es un proceso específico y reversible que modula diversas funciones biológicas y fisiológicas, pudiendo alterar la función y la actividad de diferentes proteínas. La reversibilidad es debida a que el S-NO formado es altamente lábil debido a la sensibilidad que muestra ante el estado redox

celular y también a la luz, por lo que la presencia de agentes reductores como el glutatión (GSH), ascorbato, e incluso iones metálicos, pueden favorecer la desnitrosilación (Fig. 4.1) (Astier *et al.* 2011). Por lo tanto, la S-nitrosilación/desnitrosilación son procesos dinámicos en los cuales están involucradas las RNS, agentes reductores y enzimas relacionadas con el metabolismo redox (Astier *et al.* 2011)

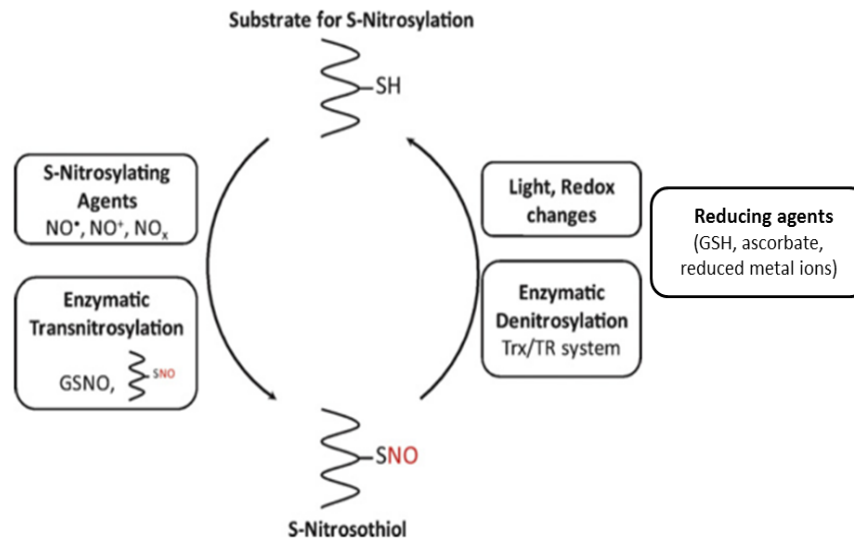


Figure 4.1. Processes of S-nitrosylation/denitrosylation. S-nitrosylation occurs on specific Cys residues in reaction with NO to form S-NO bonds. It is mediated by RNS, as well as by transnitrosylating agents, especially nitrosoglutathione (GSNO). S-nitrosothiols are very labile and sensitive to light and redox changes. Moreover, denitrosylation might be catalysed enzymatically by the thioredoxin/thioredoxin reductase (Trx/TR) system, or by the action of intracellular reducing agents. Figure taken from Astier *et al.* (2011) with some modifications. GSH, reduced glutathione.

La identificación de proteínas S-nitrosiladas se ha estudiado en diferentes especies vegetales, principalmente realizando ensayos con donadores de NO que incrementaban la posibilidad de detectar dichas proteínas (Corpas *et al.* 2015). Así, existen trabajos en los que se han detectado e identificado proteínas endógenas que sufren esta modificación usando principalmente la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Lindermayr *et al.* 2005; Romero-Puertas *et al.* 2008), aunque han sido identificadas también en otras especies como el naranjo amargo (*Citrus aurantium*) (Tanou *et al.* 2012), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Astier *et al.* 2012a), la patata (*Solanum tuberosum*) (Kato *et al.* 2013), o el guisante (*Pisum sativum* L.) (Begara-Morales *et al.* 2013), entre otras.

El *S*-nitrosoglutatión (GSNO), resultado de la nitrosilación del glutatión (GSH), es considerado como un reservorio móvil de NO que puede afectar a los procesos de trans-nitrosación entre GSNO y las proteínas susceptibles de ser nitrosiladas (Leterrier *et al.* 2011; Corpas *et al.* 2013a). La enzima ***S*-nitrosoglutatión reductasa** (GSNOR) es una proteína muy conservada en microorganismos, plantas y mamíferos que cataliza la reducción de GSNO a GSSG y NH₃, en una reacción dependiente de NADH (Liu *et al.* 2001; Sakamoto *et al.* 2002; Barroso *et al.* 2006; Guerra *et al.* 2016; Kubienova *et al.* 2016). Por lo tanto, la GSNOR juega un papel importante en el control celular de los niveles de GSNO y, por tanto, de NO (Airaki *et al.* 2011; Chaki *et al.* 2011b; Astier *et al.* 2012b). Se ha descrito que la actividad de esta enzima está directamente relacionada con los niveles celulares de SNOs, estando, por lo tanto, implicada en los mecanismos de respuesta a distintos estreses medioambientales, ya sean bióticos (Feechan *et al.* 2005; Rustérucchi *et al.* 2007; Chaki *et al.* 2009a; Kubienová *et al.* 2014; Yun *et al.* 2016) o abióticos como son los propiciados por metales pesados (Barroso *et al.* 2006), el daño mecánico (Corpas *et al.* 2008a; Chaki *et al.* 2011a; Espunya *et al.* 2012) o temperaturas extremas (Feechan *et al.* 2005; Corpas *et al.* 2008a; Kubienová *et al.* 2014; Yun *et al.* 2016). Asimismo, se ha descrito el papel que juega la GSNOR en los distintos estadios de desarrollo de las plantas tales como el pimiento (Airaki *et al.* 2015), *Arabidopsis thaliana* (Espunya *et al.* 2006; Lee *et al.* 2008; Kwon *et al.* 2012; Xu *et al.* 2013), la col (*Brassica oleracea*) o la lechuga (*Lactuca sativa*) (Tichá *et al.*, 2016). Sin embargo, el papel que pueda desempeñar esta enzima durante el proceso de maduración de frutos y su relación con el contenido de SNOs es poco conocido.

La posible función del NO endógeno durante el proceso de la maduración de frutos ha sido descrito en algunas especies vegetales como la fresa (Leshem & Pinchasov 2000), la banana (Cheng *et al.* 2009) y la aceituna (Parra-Lobato & Gómez-Jiménez 2011), y parece que podría estar relacionado con los niveles de ciertas fitohormonas tales como el etileno (Freschi 2013). Asimismo, también se ha estudiado cómo la aplicación de NO exógeno puede afectar algunos procesos en los frutos de especies tanto climatéricas como no climatéricas. La Tabla 4.1 resume algunos de los efectos más relevantes descritos hasta ahora. Recientemente se ha demostrado que el NO también parece estar implicado en el proceso de maduración de los frutos del pimiento (Chaki *et al.* 2015).

Table 4.1. Beneficial effects of exogenous NO gas application to different fruits (modified from Corpas *et al.* (2016))

Plants species	NO application	Effects	References
Strawberry (<i>Fragaria ananassa</i>) Cucumber (<i>Cucumis sativus</i>) Kiwi (<i>Actinidia sinensis</i>)	NO gas	Extends the postharvest life	Leshem <i>et al.</i> (1998)
Strawberry (<i>Fragaria ananassa</i>)	NO gas DETANO	Extends the postharvest life	Wills <i>et al.</i> (2000); Wills <i>et al.</i> (2007)
Peach fruits (<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch, cv,Feicheng)	NO gas	Extends the postharvest life, inhibition of browning on the surface, and prevents chilling injuries	(Zhu & Zhou 2006; Zhu <i>et al.</i> 2009; Zhu <i>et al.</i> 2010)
Apple (<i>Malus domestica</i> L.)	DETANO	Inhibition of browning in apple slices	Pristijono <i>et al.</i> (2008)
Japanese plum fruits (<i>Prunus salicina</i>)	NO gas	Delays ripening and alleviates chilling injury symptoms during cold storage	Singh <i>et al.</i> (2009)
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	NO gas	Alleviates chilling injury and delays fruit colour development, softening, and ripening	Zaharah and Singh (2011)
Pepper fruit (<i>Capsicum annuum</i> L)	NO gas	Delays ripening	Chaki <i>et al.</i> (2015)

DETANO, 2,2'-(Hydroxynitrosohydrazono)bis-ethanimine.

4.2 RESULTADOS/ RESULTS

4.2.1 GSNOR en frutos de pimiento: actividad específica, contenido proteico y expresión génica

La medida de la actividad específica de la GSNOR en frutos de pimientos durante la maduración mostró una disminución significativa de un 43% en frutos rojos en comparación con los frutos verdes (Fig. 4.2).

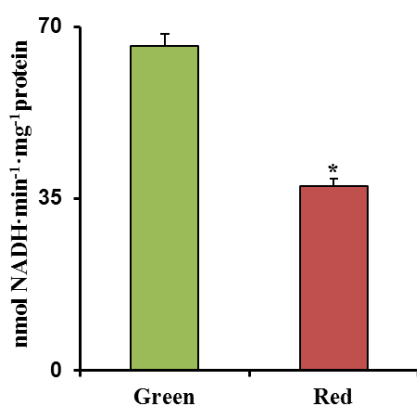


Figure 4.2. S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR) activity during the ripening of pepper fruit. Spectrophotometric assay of GSNOR activity in green and red fruits. Results are means \pm SEM of samples from at least three different experiments.* Differences between values were significant at $P < 0.05$.

Complementariamente se realizó el análisis de la actividad GSNOR en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes con el objetivo de evaluar la posible presencia de distintas isoformas de esta enzima. La Fig. 4.3a muestra la aparición de una única banda de actividad, claramente detectable en frutos verdes, mientras que en frutos rojos dicha banda era muy débil, siendo apenas perceptible, lo que corroboraba la disminución de actividad que anteriormente se había observado con la medida espectrofotométrica. Asimismo, se realizó el correspondiente *western blot* de los geles en condiciones nativas, para el cual se usó un anticuerpo específico frente a la GSNOR (dilución 1:1000). Los resultados de *western* corroboraron la existencia de una única banda en ambas muestras de frutos (Fig. 4.3a), así como una menor expresión de la proteína en el fruto rojo en comparación al verde. La Fig. 4.3b muestra el ensayo de *western blot* mediante EGPA-SDS en muestras de pimiento verde y rojo, en el cual se detectó una única banda inmunoreactiva de 45 kDa. Posteriormente, se analizó la

expresión del gen de la GSNOR y los resultados no mostraron cambios significativos entre pimiento verde y rojo (Fig. 4.3c).

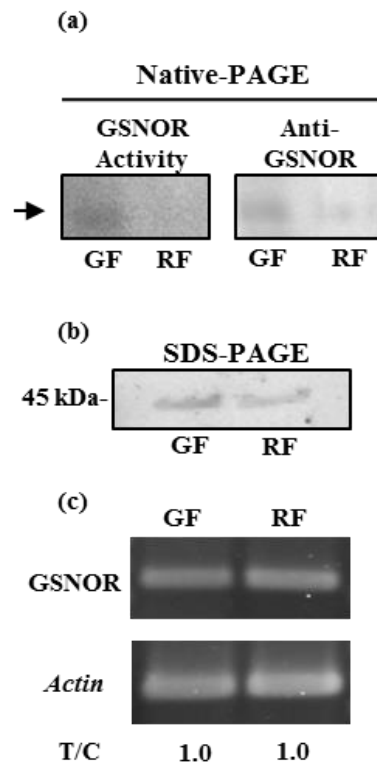


Figure 4.3. S-nitrosogluthatione reductase (GSNOR) activity in native PAGE, protein content and gene expression during the ripening of pepper fruits. (a) Native polyacrylamide gel electrophoresis of green and red pepper fruit samples stained for GSNOR activity and immuno-blot of pepper fruits extracts probed with an antibody against GSNOR (1:1000 dilution). Samples (45 μ g protein) were subjected to electrophoresis on 6% acrylamide gels (b) Immunoblot-blot from SDS-PAGE (4-20%) of pepper samples (20 μ g per lane) probed with an antibody against GSNOR (dilution 1:1000). (c) mRNA expression of GSNOR in pepper fruits. Semiquantitative RT-PCR was performed on total RNA isolated from pepper fruits. Representative agarose electrophoresis gel of amplification products visualized by Gel-red staining under UV light. *Actin* was used as internal control. T/C indicates the relative level of each amplification product (T) over the *Actin* used as internal control (C) after normalization, and expresses the change in folds. GF, green fruits; RF, red fruits.

4.2.2 Efecto del NO sobre la actividad GSNOR en frutos de pimiento

La actividad GSNOR se midió en aquellos pimientos que habían sido expuestos a una atmósfera enriquecida con NO. Así, se observó que tanto en los pimientos almacenados a 6°C como los mantenidos a temperatura ambiente (RT) tras el tratamiento con el NO,

la actividad disminuía significativamente ($p < 0,05$) en la primera semana; sin embargo, en la segunda semana y en las mismas condiciones, la actividad recuperaba los valores observados en las condiciones control (Fig. 4.4).

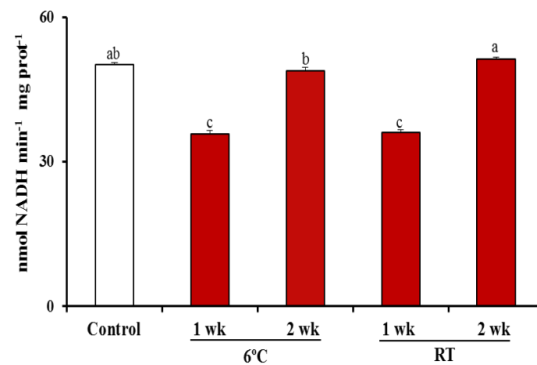


Figure 4.4. S-nitroglutathione reductase (GSNOR) activity of pepper fruit exposed to enriched NO atmosphere. Spectrofotometric assay of GSNOR activity was followed to analyze fruits 1-2 weeks after NO treatment. Results are means \pm SEM of samples from at least three different experiments. Column values with distinct letter are significantly different.

Asimismo, se analizó la actividad de la GSNOR y su expresión proteica en geles tanto no desnaturizantes como en presencia de SDS. En los geles no desnaturizantes se detectó la actividad isoenzimática apreciándose una única banda, aunque sin cambios aparentes entre muestras (Fig. 4.5a, panel izquierdo). Por otro lado, el *immunoblot* realizado en geles no desnaturizantes con el anticuerpo específico frente a la GSNOR (dilución 1:1000) (Fig. 4.5a, panel derecho) mostraba ligeros cambios de los tratamientos con respecto al control, pero ninguno de ellos fue destacable. En el caso del *western* realizado en geles desnaturizantes (Fig. 4.5b) se observó una tendencia similar a la encontrada en el ensayo espectrofotométrico, ya que en las muestras tratadas y almacenadas tanto a 6 °C como a temperatura ambiente (RT), la expresión disminuía respecto al control en la primera semana, mientras que en la segunda semana la expresión no variaba de forma significativa.

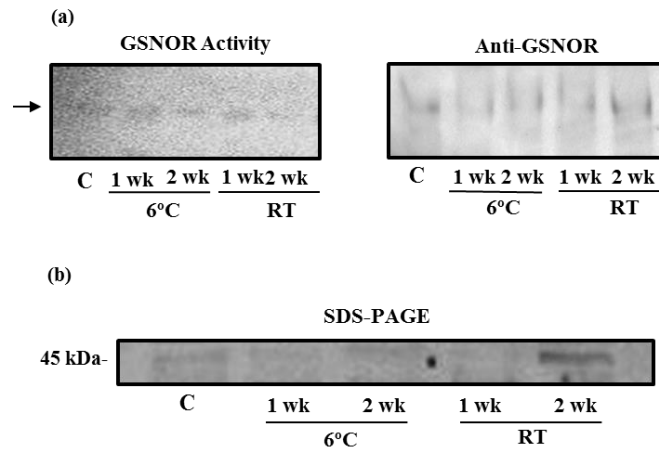


Figure 4.5. Activity and protein expression of *S*-nitrosogluthation reductase (GSNOR) after pepper fruits were exposed to enriched-NO atmosphere. (a) Native polyacrylamide gel electrophoresis of pepper fruits after treatments with NO gas with staining for GSNOR activity (left), and its corresponding immuno-blot (right) probed with an antibody against GSNOR (1:1000 dilution). Samples (45 μ g proteins) were subjected to electrophoresis on 6% acrylamide gels (b) SDS-PAGE (4-20%) and immuno-blot (20 μ g per lane) probed with antibody against GSNOR (dilution 1:1000). C, control; 1 wk, 1 week; 2 wk, 2 weeks; and RT, room temperature.

4.2.3 Detección de *S*-nitrosotioles proteicos en frutos de pimiento verde y rojo

Dada la correlación directa entre la actividad GSNOR y los nitrosotioles (SNOs), se analizó el contenido de nitrosotioles proteicos totales durante el proceso de la maduración en frutos de pimiento. Para ello se optimizó para muestras vegetales una técnica de detección de SNOs en geles de poliacrilamida descrita previamente en células animales (King et al., 2005). Se realizó una electroforesis en condiciones no reductoras y posteriormente se expuso el gel a radiación UV (302-312 nm), la cual provoca la liberación del NO unido a las proteínas *S*-nitrosiladas. El NO liberado fue posteriormente detectado usando un fluoróforo específico (DAF-FM) según se especificó en el apartado 11 de Material y Métodos.

En la Fig. 4.6a se aprecia la detección de *S*-nitrosotioles proteicos correspondientes a muestras de pimiento verde y rojo. Los resultados muestran la presencia de dos bandas en ambas muestras, denominadas B1 y B2. Se puede comprobar cómo la intensidad de ambas bandas aumentaba en las muestras de pimiento rojo con respecto al pimiento verde. De hecho, la cuantificación de las mismas reveló que el contenido de *S*-nitrosotioles proteicos era un 80% superior en pimiento rojo. Para

corroborar la especificidad del método y los posibles artefactos experimentales en la detección de estos SNOs, se realizaron diferentes controles internos. Así las muestras de pimiento rojo se preincubaron durante 3 h a 25°C con diferentes agentes capaces de descomponer los SNOs o de bloquear los tioles libres, tales como ditioneitol (DTT), ascorbato, CuCl, *N*-etilmaleimida (NEM), glutatión reducido (GSH), β-mercapetanol (βME) y radiación UV. Tal y como se observa en la Fig. 4.6b, la incubación con diferentes agentes capaces de descomponer SNOs de manera conjunta, como el ascorbato, el CuCl y la *N*-etilmaleimida (NEM), que bloquean los tioles libres, o con diferentes agentes reductores como el DTT, GSH y ME, provocaba una reducción significativa e incluso la desaparición de la señal fluorescente correspondiente a las proteínas *S*-nitrosiladas. Como control negativo se utilizó el cPTIO (secuestrador de NO), y tal y como se aprecia en la Fig. 4.6c, este compuesto afectó eficientemente la fluorescencia detectada con DAF-FM, reduciéndola en un 84% en el caso de la B1 y casi el 100% en la B2, en comparación con la muestra control.

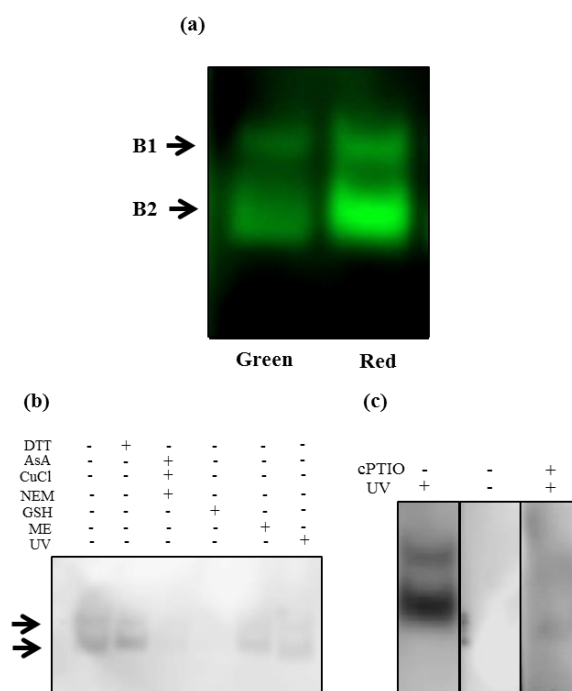
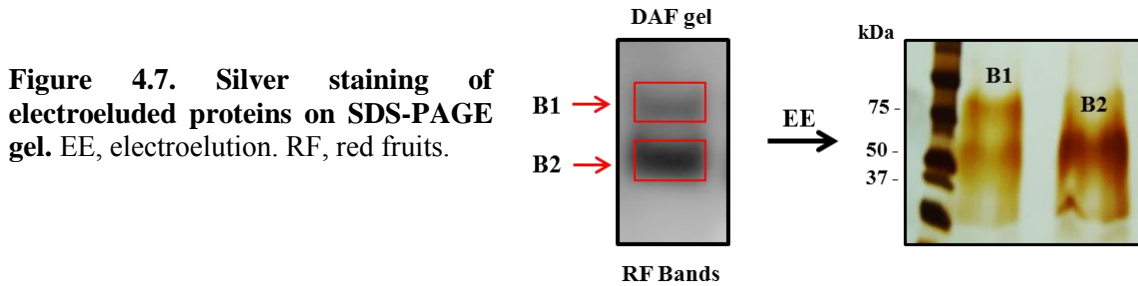


Figure 4.6. Endogenous detection of *S*-nitrosylated (*S*-nitrosated) proteins in pepper fruits on DAF gels. (a) Detection of endogenous *S*-nitrosylated proteins in green and red pepper fruits. Protein samples (25 μg) were separated by SDS-PAGE (gradient gels 4-20%) under non-reducing conditions. The gel was coated with DAF-FM, a fluorescent probe to detect NO, exposed to UV light after electrophoresis, and imaged with a fluorimager. **(b)** As internal control, red pepper samples were pre-treated with different chemicals including 20 mM dithiothreitol (DTT), 20 mM ascorbate (AsA), 0.1 mM CuCl, 5 mM *N*-ethylmaleimide (NEM), 20 mM reduced glutathione (GSH), and 100 mM β-mercapthoethanol (βME). **(c)** As a control of NO production, the gel was coated with cPTIO (an NO scavenger) and the green fluorescence was greatly reduced.

Con el objetivo de identificar las proteínas de pimiento susceptibles de ser *S*-nitrosiladas, las proteínas de cada una de las bandas fueron sometidas a un proceso de electroelución (EE) y posterior espectrometría de masas. Las proteínas electroeluidas fueron analizadas en un gel de SDS-PAGE, el cual, una vez teñido con nitrato plata, permitió corroborar la eficiencia de la electroelución (Fig. 4.7).



Posteriormente, se llevó a cabo un análisis preliminar mediante MALDI-TOF/TOF con el fin de identificar las posibles proteínas *S*-nitrosiladas. Los análisis mostraron la presencia de aproximadamente 20 proteínas, la mayoría de las cuales no han sido todavía caracterizadas totalmente. Sin embargo, los resultados preliminares aportaron algunas proteínas como la citocromo *c* oxidasa, la peroxirredoxina II E y la alcohol deshidrogenasa, que previamente ya habían sido identificadas en otras especies vegetales como proteínas que sufren un proceso de *S*-nitrosilación, lo que permite confirmar que el método para detectar estas proteínas es efectivo con muestras vegetales (Tabla 4.2).

Table 4.2. Putative pepper proteins identified as susceptible to be *S*-nitrosylated. Preliminary data obtained by MALDI TOF/TOF of the electroeluted proteins from B1 and B2 bands (see Fig. 4.6a).

PUTATIVE CANDIDATES FOR S-NITROSYLATED PROTEINS BY MALDI TOF/TOF				
GEL BAND DAF-FM	ENTRY NAME	PROTEIN	MASCOT SCORE	FUNCTION
B1	B9T7H9_RICCO	Putative uncharacterized protein	99.677	
	PS17_PINST	Cytochrome c oxidase subunit II PS17	86.827	
	D4I633_NICTO	Alcohol dehydrogenase	78.636	Molecular function; oxidoreductase activity. Zinc ion binding
B2	J3I48_ORYBR	Uncharacterized protein	99.522	Biological process. Secondary shoot formation. Strigolactone biosynthetic process
	D4I627_9SOLA	Alcohol dehydrogenase	97.051	Molecular function; oxidoreductase activity Zinc ion binding
	PR2E2_ORYSJ	Peroxiredoxin-2E-2, chloroplastic	85.556	Antioxidant Oxidoreductase Peroxidase

De entre las proteínas identificadas por espectrometría de masas, se seleccionó la citocromo *c* oxidasa de frutos de pimiento para realizar ensayos *in vitro* del efecto sobre dicha enzima de distintas moléculas, entre las que se incluyeron diferentes RNS (NO y ONOO⁻), así como agentes reductores (GSH y DTT), oxidantes (H₂O₂) y un inhibidor genérico de la actividad como el cianuro. La Figura 4.8 muestra los resultados del ensayo espectrofotométrico de la actividad citocromo *c* oxidasa de frutos de pimiento verdes, la cual se ve significativamente disminuida por la incubación con todas las moléculas ensayadas, destacando el efecto de los donadores de ONOO⁻ (SIN-1) y de NO (DeaNONOate), ya que ambos inhibían casi un 100% de la actividad de la enzima. Asimismo, agentes como el DTT y el KCN también provocan una inhibición significativa, siendo esta disminución de entre 80-87%. El resto de agentes provocaban una inhibición de entre un 40-50%.

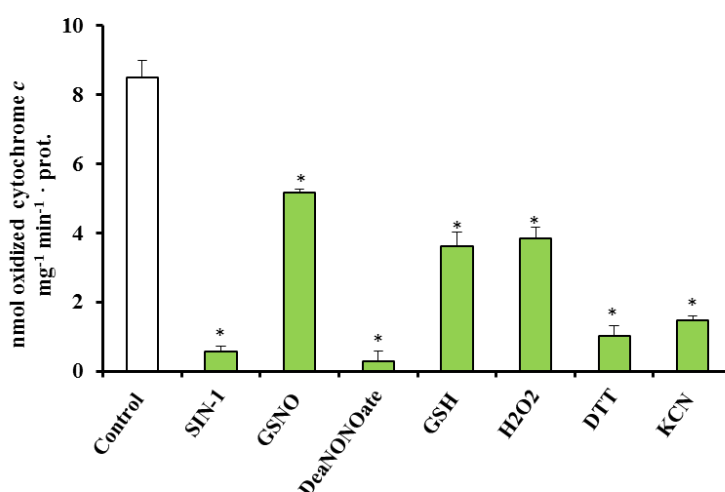


Figure 4.8. *In vitro* effect of different chemicals on the cytochrome *c* oxidase activity from pepper. Crude extracts from green fruits were incubated in absence/presence of 2 mM SIN-1; 2 mM GSNO; 2 mM DeaNONOate; 2 mM GSH; 5 mM DTT; 5 mM H₂O₂; 5 mM KCN, and cytochrome *c* oxidase was determined.*significant difference with respect to control (p<0.05)

4.3 DISCUSIÓN/ DICUSSION

Los frutos de pimientos se incluyen en el grupo de frutos no climatéricos ya que, a diferencia de los climatéricos como la banana o el tomate, su maduración no está regulada por un aumento en la biosíntesis de etileno así como de la respiración (Symons *et al.* 2012). Sin embargo, a nivel fisiológico y bioquímico, se ha observado cómo el NO está involucrado en este proceso a través de la regulación de algunas actividades

enzimáticas mediante modificaciones post-traduccionales, como es el caso de la catalasa (Chaki *et al.* 2015; Palma *et al.* 2015). A pesar de ello, aún es escasa la información sobre el metabolismo del NO en frutos de pimiento.

Trabajos recientes en nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto el efecto beneficioso del NO sobre frutos de pimiento al ser expuestos a atmósferas enriquecidas con este gas (Chaki *et al.* 2015), principalmente con un aumento de los niveles de vitamina C (esta Tesis Doctoral; Rodríguez-Ruiz *et al.* 2017). De la misma forma, dicho efecto positivo se ha visto en otros trabajos sobre diferentes frutos al ser expuestos a atmósferas controladas y enriquecidas con NO (Cheng *et al.* 2009). Como ejemplo de ello, se ha observado cómo la aplicación de NO de forma exógena sobre frutos como la banana (climatérico) reducía la producción de etileno; esto se asociaba a la reducción de la actividad 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACO), enzima involucrada en el último paso de la producción de etileno, y como consecuencia de ello se producía un retraso en la maduración de dicho fruto (Singh *et al.* 2013).

Con el propósito de ahondar en el conocimiento del metabolismo del NO en el fruto de pimiento, este capítulo se ha enfocado en analizar la modulación de la enzima GSNOR durante la maduración de pimiento así como su correlación con el perfil de SNOs proteicos durante este proceso, debido a que la información acerca de la función de esta enzima durante el desarrollo de frutos es aún muy escasa. Trabajos relacionados con el papel de la GSNOR durante el desarrollo en plantas ponen de manifiesto la importancia de esta enzima durante el desarrollo y el crecimiento de la planta en condiciones fisiológicas óptimas (Lee *et al.* 2008; Tichá *et al.* 2016). Estudios relacionados con el análisis de expresión, localización y actividad de la GSNOR en órganos de *Arabidopsis thaliana* han mostrado cómo esta enzima a lo largo del desarrollo presenta un patrón diferente. Dichos datos probaban que hay una mayor actividad y expresión en las primera etapas del desarrollo tanto en raíces como en hojas (Espunya *et al.* 2006). La misma tendencia se ha observado en tomate, donde las raíces y tallos mostraban una mayor actividad GSNOR que en hojas jóvenes. Asimismo, la expresión aumentaba en pistilos y estambres y en los frutos durante la maduración (Kubienová *et al.* 2013), sugiriendo que la GSNOR podría tener una mayor relevancia tanto en el desarrollo floral como en la formación del fruto. Los resultados presentados en este capítulo concuerdan con los ya obtenidos en otras especies, donde se ha observado un descenso de la actividad enzimática durante el proceso de maduración. De

la misma forma, el análisis realizado por *immunoblot* también coincide con los resultados ya descritos en especies como girasol (Chaki *et al.* 2009a), tomate (Kubienová *et al.* 2013) o guisante (Barroso *et al.* 2013). En cuanto a los análisis realizados sobre la modulación en la expresión del gen de la GSNOR, éstos siguen el mismo comportamiento al observado en otros genes, como el de la catalasa, superóxido dismutasas o NADP-deshidrogenasas, durante la maduración en frutos de pimiento (Mateos *et al.* 2013), sugiriendo esto, que la regulación en frutos pimientos puede estar ocurriendo a nivel post-traducciona. En este sentido, datos obtenidos recientemente, demuestran que la GSNOR puede experimentar un proceso de *S*-nitrosilación, el cual provocaría su inhibición y en consecuencia un incremento en el nivel total de SNOs (Guerra *et al.* 2016).

Debido a la correlación existente entre la actividad de la GSNOR y el nivel de SNOs totales, el análisis de estos a lo largo de la maduración ha sido uno de los puntos tratados durante este trabajo. Los resultados obtenidos muestran cómo a lo largo de este proceso se produce un incremento en el nivel de SNOs proteicos lo cual estaba muy relacionado con la disminución de la actividad enzimática GSNOR. Se han publicado comportamientos similares en especies como *Arabidopsis thaliana* donde plántulas expuestas al herbicida paraquat mostraban una inhibición de la actividad GSNOR, frente a un incremento de los SNOs (Guerra *et al.* 2016). De la misma manera, en trabajos sobre esta enzima frente a diferentes tipos de estrés, se observaba la misma tendencia. Así en plántulas de girasol (*Helianthus annuus*) expuestas a alta temperatura, éstas presentaban una reducción de la actividad, así como de expresión proteica y génica de la GSNOR, que estaban acompañados por un aumento simultáneo en el nivel de SNOs. Esto sugiere, por tanto, que la GSNOR modula los niveles de SNOs, siendo éstos fuentes celulares de NO que estarían implicados, en cierta manera, en el estado redox celular (Chaki *et al.* 2009a). Por otro lado, en hipocotilos de girasol expuestos a un daño mecánico la respuesta de la GSNOR fue también similar (Chaki *et al.* 2011b). En plantas de pimiento expuestas a baja temperatura el comportamiento era diferente, ya que se producía un aumento de la actividad GSNOR, pero también de los SNOs (Airaki *et al.* 2012), por lo que tendría que funcionar un mecanismo alternativo.

Se ha descrito cómo el tratamiento exógeno con NO en frutos como la banana o en plántulas de col mejoraba la tolerancia al daño por refrigeración, favoreciendo a su vez a los equipos antioxidantes enzimáticos (Fan *et al.* 2014; Wu *et al.* 2014). De

manera similar, se vio cómo la adición de NO propiciaba la resistencia al estrés oxidativo provocado por la salinidad en plantas de tomate con la inducción incluso de nuevas isoenzimas de CuZn-SOD (Manai *et al.* 2014). Los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral complementan los obtenidos en trabajos anteriores por nuestro grupo, donde se ha observado que el tratamiento de los frutos de pimiento con atmósferas enriquecidas en NO provocaba un retraso en la maduración de los frutos.

En definitiva, la maduración del pimiento está caracterizada por cambios drásticos a nivel fisiológico y bioquímico en los cuales el NO y otras RNS están involucrados. Anteriormente se ha mostrado que el NO disminuye durante el proceso de la maduración, acompañado de un incremento en el patrón de proteínas nitradas, entre las que destacaba la catalasa una diana importante en la cual la actividad disminuye en pimientos rojos (Chaki *et al.* 2015). Los datos obtenidos a lo largo de este trabajo sugieren la presencia de un estrés nitro-oxidativo similar al observado en órganos como hojas y raíces durante la senescencia (Corpas *et al.* 2004; Begara-Morales *et al.* 2013). La disminución de la actividad GSNOR observada durante la maduración concuerda con el aumento observado en los SNOs proteicos, los cuales son un reservorio de NO, actuando como un mecanismo de regulación en la función de ciertas proteínas (Begara-Morales *et al.*, 2016).

En este estudio se propone un modelo, representando el papel de las RNS durante la maduración del fruto de pimiento, en el cual el metabolismo del NO juega un papel importante (Fig. 4.9). Este proceso está caracterizado por un incremento en la nitración (Chaki *et al.* 2015) y en la *S*-nitrosilación de proteínas, con una disminución en la actividad de la GSNOR durante la transición de frutos verdes a rojos. Esto supone una nueva pieza en el puzzle que ayuda a aclarar el papel de NO durante el proceso de maduración, y que podría tener aplicaciones biotecnológicas en el campo de la post-cosecha, ya que aplicaciones pequeñas de NO exógeno podrían retrasar la maduración de los frutos e incluso mejorar las propiedades nutricionales de este producto hortícola.

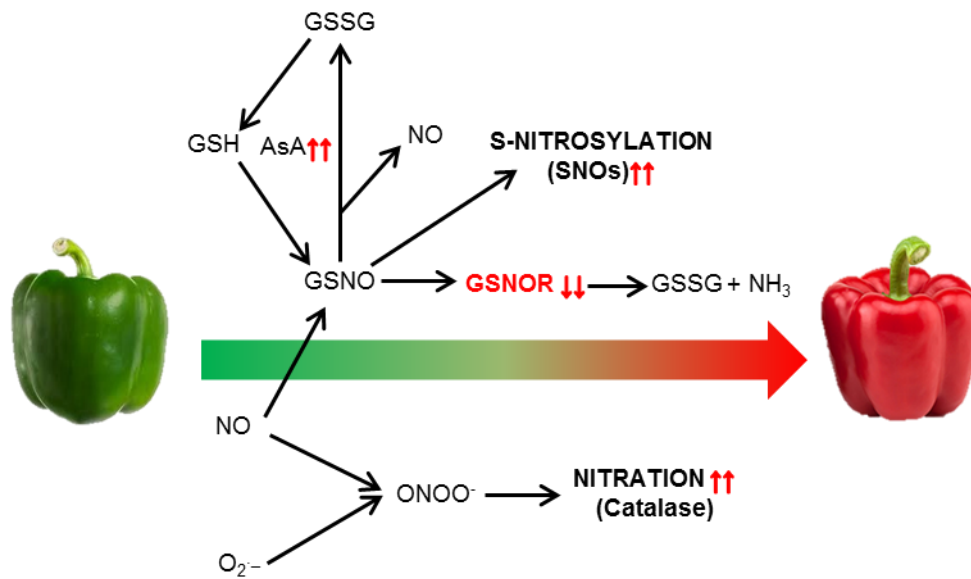


Figure 4.9. Proposed model for the involvement of reactive nitrogen species (RNS) on the ripening of pepper fruits. Nitric oxide (NO) reacts with reduced glutathione (GSH) to form *S*-nitrosoglutathione (GSNO). This *S*-nitrosothiol (SNO) can be converted by the enzyme *S*-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) by a process of NADH-dependent denitrosylation into oxidized glutathione (GSSG) and NH₃. Furthermore, SNOs like GSNO can be broken down to produce NO and GSSG in the presence of reducing agents such as ascorbate (AsA) or GSH. On the other hand, a post-translational modification such as nitration is taken place during ripening, in a process which involves peroxynitrite through the reaction of NO and superoxide radicals (O₂^{•-}).

DISCUSIÓN GENERAL
OVERALL DISCUSSION

El objetivo principal del trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral ha sido el estudio de los principales sistemas antioxidantes durante los procesos de maduración y post-cosecha en el fruto de pimiento (*Capsicum annum* L.), así como su interacción con algunas especies de nitrógeno reactivo (RNS) y la posible implicación de éstas en ambos eventos fisiológicos. Dicho objetivo general se ha abordado mediante la caracterización bioquímica y molecular de algunos de los sistemas antioxidantes, que adquieren un papel importante a lo largo de estos procesos.

A tenor de los resultados que se han obtenido en esta Tesis se puede decir que los sistemas antioxidantes son esenciales en el proceso de maduración, y son modulados a lo largo de este periodo de manera coordinada, dando lugar a importantes cambios que marcan la calidad final del fruto. Se ha prestado especial atención a antioxidantes enzimáticos como la catalasa, donde su modulación negativa a lo largo de la maduración podría propiciar el aumento del H₂O₂, pudiendo ser esta molécula una pieza clave en el proceso de maduración. Este desequilibrio en los niveles de peróxido de hidrógeno podría estar siendo compensado por el incremento de la actividad de la APX durante la maduración, en una acción que podría ser sinérgica con la de las SODs, que sigue un patrón similar. De manera global, los resultados muestran cómo el proceso de maduración es un proceso coordinado en el cual los sistemas antioxidantes intervienen de manera activa frente al estrés oxidativo que está teniendo lugar, como muestra el perfil de peroxidación lipídica, cobrando protagonismo componentes enzimáticos de orgánulos como los peroxisomas (catalasa y Fe-SOD).

En estudios previos se ha observado cómo la domesticación de los cultivos genera una disminución de los niveles de ascorbato (vitamina C) como consecuencia de la manipulación humana (Gest et al. 2013). El conocimiento de los procesos involucrados en las vías de síntesis y degradación de este antioxidante permitiría una manipulación eficiente de los cultivos, pudiendo mejorar la calidad nutricional de los mismos (Bartoli et al. 2016). Debido a la importancia nutricional y económica del pimiento, y a que es una de las hortalizas con mayor contenido en vitamina C (Palma et al. 2009, 2011a Martí et al. 2011), otro de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio detallado de la modulación de este antioxidante, así como de las enzimas que lo regulan y la identificación de los metabolitos de síntesis y degradación del mismo. Diferentes factores como el tipo de cultivo, las condiciones de cultivo y los factores ambientales como la temperatura o la radiación afectan a los

niveles de ascorbato durante el proceso de maduración (Gautier *et al.* 2009; Bartoli *et al.* 2016). Diversos trabajos realizados en fruto de pimiento revelan el diferente comportamiento en el contenido de este antioxidante durante este proceso fisiológico. Así, en cultivos de pimiento, autores como Howard *et al.* (2000) o Estrada *et al.* (2000) detectaron incrementos de ascorbato durante la maduración de estos frutos. Sin embargo, otros trabajos, no han encontrado cambios importantes entre los frutos inmaduros y los maduros (Martí *et al.*, 2009, 2011a; Palma *et al.* 2015). Los resultados obtenidos durante esta Tesis Doctoral muestran altos niveles de ascorbato en los frutos de pimiento, que posiblemente son mantenidos por la actividad GalLDH, que no sufre variaciones durante la maduración. Estos altos niveles de ascorbato podrían actuar manteniendo el estado redox de los frutos a fin de contrarrestar los notables cambios metabólicos que están teniendo lugar en los mismos durante este proceso.

En base a todo lo expuesto, podemos decir que el ascorbato, que es una molécula de vital importancia también en la nutrición humana también lo es para la fisiología del pimiento. La mayor fuente de vitamina C para los humanos proviene de las frutas y verduras, siendo el pimiento uno de los vegetales más ricos en este antioxidante que son consumidos a nivel mundial (Palma *et al.*, 2015). La búsqueda de alternativas de cultivo que permitan a las plantas aportar más nutrientes sin la aplicación de contaminantes o la realización de actividades perjudiciales para el medio ambiente es hoy día una parte esencial del sector agroalimentario. Por otro lado, el conocimiento de cómo funciona en la planta el metabolismo de los compuestos que van dirigidos al consumo humano es, por tanto, un elemento clave a incorporar y desarrollar en las estrategias futuras de dicho sector.

Otra de los aspectos estudiados en esta Tesis Doctoral ha sido intentar comprender el metabolismo de las RNS durante la maduración y de qué forma interaccionan estas moléculas con los diferentes sistemas antioxidantes. Teniendo en cuenta la importancia del NO en diferentes procesos fisiológicos, se ha profundizado en el metabolismo de enzimas como la GSNOR, ya que se ha demostrado que dicha proteína tiene importancia durante el desarrollo y el crecimiento de las plantas (Lee *et al.* 2008; Tichá *et al.* 2016). Así, los resultados obtenidos muestran una modulación negativa de la GSNOR que podría ser una de las causas del aumento en los niveles de SNOs proteicos, los cuales actuarían de reservorio de NO, permitiendo a esta molécula y a otras RNS derivadas ejercer su acción durante la maduración.

En la Tabla 10 se compendian los resultados más importantes de la modulación del metabolismo de las ROS y RNS durante la maduración de frutos de pimiento, observándose cómo las enzimas relacionadas con el ascorbato aumentan en relación a aquellas encargadas de eliminar o mantener otras ROS en la célula, como la catalasa.

Table 60. Modulation of the ROS and RNS metabolism during the ripening of pepper fruits. Arrows indicate how the parameters indicated in the table evolve during the fruit ripening, either increasing (↑) or decreasing (↓).

ROS metabolism	% Modulation natural ripening
Enzymatic	
Catalase (CAT)	↓24 %
Guaiacol peroxidase (GPX)	↓10 %
Superoxide dismutase (SODs) (Fe-SOD)	↑23 %
Ascorbate peroxidase (APX)	↑49 %
Monodehydroascorbate reductase (MDAR)	↑39 %
Dehydroascorbate reductase (DAR)	↓10 %
Glutathione reductase (GR)	↑38 %
Non-enzymatic	
Ascorbate (AsA)	↑ 9 %
Ascorbate biosynthesis	
Galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH)	↑14 %
Reactive nitrogen species (RNS)	
Nitrosoglutathione reductase (GSNOR)	↓43 %
Nitric oxide (NO)	↓63 %
Protein nitrosothiols (SNOs)	↑ 80%

Basándonos en datos previos obtenidos por nuestro grupo de investigación (Chaki *et al.* 2015), donde se había observado cómo el NO estaba involucrado en la regulación de actividades enzimáticas como la de la catalasa a través de PTMs, durante este trabajo se han llevado a cabo diferentes ensayos con donadores de NO que nos han permitido comprobar cómo las RNS también podrían regular la actividad de otras enzimas clave a través de PTMs, como la APX o la CCO; esta última, parece ser además una posible diana de *S*-nitrosilación durante el proceso de maduración, tal y como se muestra en los resultados de esta Tesis. La Tabla 11 recoge el efecto del óxido nítrico, peroxinitrito y reductores empleados a lo largo de este trabajo sobre las principales enzimas estudiadas.

Table 11. Effect of NO, ONOO⁻ and reductants on some pepper enzymatic activities under *in vitro* assays considering the higher concentration used for these molecules in the assays. Arrows indicate how the parameters indicated in the table evolve during the fruit ripening, either increasing (↑) or decreasing (↓).

Enzymes	NO	ONOO ⁻	Reductants (GSH, others)
Catalase (CAT)	↓72%	↓ 45%	ND
Ascorbate peroxidase (APX)	↓83%	↓≈ 100%	ND
Cytochrome c oxidase (CCO)	↓ ≈ 100%	↓≈ 100%	↓40-60%
Galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH)	NE	NE	↓60%
Superoxide dismutase (SODs)	NE	NE	NE

NE, no effect. ND, not determined.

La búsqueda de estrategias que mejoren la calidad de los frutos en los periodos post-cosecha es hoy día un área que está adquiriendo una gran importancia, ya que durante estos periodos los frutos se ven sometidos a cambios que van a condicionar la calidad final del producto. Basándonos en los resultados previos del NO sobre los frutos de pimiento, los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral corroboran que además de provocar un retraso en la maduración, **el NO provoca un aumento importante en el contenido de ascorbato**. Este es un hecho inédito, no sólo desde el punto de vista de las prácticas del cultivo del pimiento y/o de otros cultivos, sino que representa un gran avance en la propia generación de conocimiento en esta área de la biología vegetal. La Tabla 12 recoge el efecto sobre algunos de los componentes del metabolismo de especies de oxígeno y nitrógeno reactivos de frutos de pimiento expuestos a atmósferas enriquecidas en NO. Los resultados muestran que la aplicación exógena del NO provoca una mejora en las propiedades nutritivas del pimiento, y por tanto podría tener una gran relevancia desde un punto de vista agro-alimentario y económico.

Table 12. Effect of an enriched-NO atmosphere on some components of the metabolism of ROS and RNS of pepper fruit. Arrows indicate how the parameters indicated in the table evolve during the fruit ripening, either increasing (↑) or decreasing (↓).

Components	Enriched-NO atmosphere
Ascorbate (Asa)	↑ 42 %
Galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH)	↑ 300 %
Ascorbate peroxidase (APX)	↑ 37%
Superoxide dismutase (SODs)	↑↑
Peroxidases (PODs)	↑↑
Dehydroascorbate reductase (DAR)	↑↑
Glutathione reductase (GR)	NE
Nitrosoglutathione reductase (GSNOR)	NE

NE, no effect

Con todo, podríamos decir que el proceso de maduración y post-cosecha en los frutos de pimiento estaría siendo regulado por la interacción entre las RNS y los sistemas antioxidantes, pudiendo establecer así un modelo representativo del metabolismo que tiene lugar durante estos procesos, tal y como se muestra en la figura 4.8 de esta memoria.

En resumen, esta Tesis Doctoral ha contribuido a la comprensión de procesos fisiológicos como la maduración y la post-cosecha en los frutos de pimiento, así como su interacción con RNS, aportando los siguientes hitos:

- Caracterización por primera vez de las enzimas antioxidantes, catalasa y Fe-SOD, durante la maduración de los frutos de pimiento. En el caso de la catalasa se observa que presenta características moleculares atípicas en comparación con la de otras especies vegetales, lo que merece ser estudiado en más profundidad.
- Durante la maduración se producen cambios en el metabolismo de NO, con una disminución de la actividad GSNOR y un aumento concomitante de los SNOs proteicos los cuales podría actuar de reservorio de NO.
- Caracterización de la enzima galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH) que cataliza la última etapa en la biosíntesis de ascorbato, así como la identificación de metabolitos intermediarios en la síntesis y degradación de ascorbato.
- Pimientos expuesto a atmósferas enriquecidas con NO presentan una mayor actividad GalLDH y del contenido de ascorbato.

The main goal of this PhD Thesis has been to study the mayor antioxidant systems during the ripening and post-harvest processes in the pepper fruit (*Capsicum annum* L.), as well as their interaction with some reactive nitrogen species (RNS) and the possible involvement of these latest compounds in both physiological events. This general goal has been done through the biochemical and molecular characterization of some of the antioxidant systems which play an important role throughout those processes.

According to the obtained results, it can be point out that antioxidant systems are essential in the ripening process, and are regulated throughout this physiological stage in a coordinated way, leading to important changes which determine the final quality of the pepper fruit. Particular attention has been paid to enzymatic antioxidants such as catalase, where its negative modulation during ripening could lead to an increase in H₂O₂, which may be a key element in the maturation process. This imbalance in the hydrogen peroxide levels could be offset by increased APX activity during ripening in an action that could be synergistic with that of SODs, which shows a similar pattern. Overall, the results demonstrate how the pepper fruit ripening is a coordinated process in which the antioxidant systems actively mediate against the oxidative stress that is taking place, as the lipid peroxidation profile shows, where enzymatic components (catalase and Fe-SOD) of organelles such as peroxisomes might be relevant.

In previous studies, it has been observed how the domestication of the pepper crops generates a decrease of the ascorbate levels (vitamin C) as a consequence of the human manipulation (Gest et al., 2013). The knowledge of the processes involved in the synthesis and degradation pathways of this antioxidant would allow an efficient manipulation of the crops, being possible to improve the nutritional quality of them (Bartoli et al., 2016). Due to the nutritional and economic significance of pepper, since it is one of the vegetables with the highest vitamin C content (Palma et al., 2009a Martí et al., 2011), another of the main objectives of this PhD Thesis has been the detailed study of the modulation of this antioxidant, including the enzymes that regulate it as well as the identification of the metabolites of its synthesis and degradation. Different factors such as the type of crop and environmental factors like temperature or radiation affect the levels of ascorbate during the ripening process (Gautier et al., 2009; Bartoli et al., 2016). Several works carried out on pepper fruit reveal the different behavior in the content of this antioxidant during this physiological process. Thus, in pepper crops, authors such as Howard et al. (2000) or Estrada et al. (2000) detected increases in

ascorbate during ripening. However, other studies have found no significant changes between immature and mature fruits (Martí et al, 2009, 2011a; Palma et al., 2015). The results obtained during this PhD Thesis show high levels of ascorbate in the pepper fruits, which are possibly maintained by the GalLDH activity, which does not undergo changes during ripening. These high levels of ascorbate could act to maintain the redox state of the fruits in order to counteract the remarkable metabolic changes that are taking place during this process.

Considering all the above, we can confirm that ascorbate, which is a molecule of vital importance in human nutrition, is also important for the physiology of pepper. The major source of vitamin C for humans comes from fruits and vegetables, being the pepper one of the richest vegetables in this antioxidant that are consumed worldwide (Palma et al., 2015). The search for alternative crops that allow plants to provide more nutrients without the application of potential pollutants or harmful activities to the environment is now an essential piece of the food industry sector. On the other hand, the knowledge of how the metabolism of the compounds that are destined for human consumption works in the plant is, therefore, a key element to be incorporated and to be developed in future strategies of this sector.

Another aspect accomplished in this Thesis has been to try to understand the metabolism of RNS during ripening and how these molecules interact with the different antioxidant systems. Taking into account the relevance of NO in different physiological processes, the metabolism of enzymes such as GSNOR has been deepened, since it has been shown that this enzyme plays a key function during the development and growth of plants (Lee *et al.* 2008; Tichá *et al.* 2016). Thus, our results show a negative modulation of the GSNOR that could be one of the reasons of the increase in the levels of protein SNOs, which would act as a NO reservoir, thus allowing this molecule and other RNS to exert their action during ripening.

Table 10 summarizes the most important results of ROS and RNS metabolism modulation during pepper fruit ripening, displaying how the ascorbate-related enzymes increase with respect to those responsible for the control of other ROS in the cell, such as catalase.

Table 70. Modulation of the ROS and RNS metabolism during the ripening of pepper fruits. Arrows indicate how the parameters indicated in the table evolve during the fruit ripening, either increasing (↑) or decreasing (↓).

ROS metabolism	% Modulation natural ripening
Enzymatic	
Catalase (CAT)	↓24 %
Guaiacol peroxidase (GPX)	↓10 %
Superoxide dismutase (SODs) (Fe-SOD)	↑23 %
Ascorbate peroxidase (APX)	↑49 %
Monodehydroascorbate reductase (MDAR)	↑39 %
Dehydroascorbate reductase (DAR)	↓10 %
Glutathione reductase (GR)	↑38 %
Non-enzymatic	
Ascorbate (AsA)	↑ 9 %
Ascorbate biosynthesis	
Galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH)	↑14 %
Reactive nitrogen species (RNS)	
Nitroglutathione reductase (GSNOR)	↓43 %
Nitric oxide (NO)	↓63 %
Protein nitrosothiols (SNOs)	↑ 80%

Based on previous data obtained by our research group (Chaki *et al.* 2015), where it was observed that NO was involved through PTMs in the regulation of enzymatic activities such as catalase, during this work it has been developed different assays using NO donors that have allowed us to verify how RNS could also regulate the activity of other key enzymes through PTMs, such as APX or CCO. The latter seems to be a possible target for S-nitrosylation during the ripening process, as shown in the results of this Thesis Table 2 shows the effect of nitric oxide, peroxyxynitrite and reducing agents used throughout this work on the main analyzed enzymes.

Table 11. Effect of NO, ONOO⁻ and reducing agentss on some pepper enzymatic activities under in vitro assays considering the higher concentration used for these molecules in the assays. Arrows indicate how the parameters indicated in the table evolve during the fruit ripening, either increasing (↑) or decreasing (↓).

Enzymes	NO	ONOO ⁻	Reductants (GSH, others)
Catalase (CAT)	↓72%	↓ 45%	ND
Ascorbate peroxidase (APX)	↓83%	↓≈ 100%	ND
Cytochrome c oxidase (CCO)	↓ ≈ 100%	↓≈ 100%	↓40-60%
Galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH)	NE	NE	↓60%
Superoxide dismutase (SODs)	NE	NE	NE

NE, no effect. ND, not determined.

The search for strategies that improve the quality of fruits in the post-harvest stages is now an area that is becoming very important, since during these periods the fruits are subjected to changes that will determine the final quality of the product. Based on the previous results on the effect of NO on pepper fruits, the data obtained in this PhD Thesis corroborate that, in addition to causing a delay in maturation, **NO provokes a significant increase in the ascorbate content**. This is an unprecedented fact, not only from the point of view of the practices of the pepper and/or other crops, but it represents a great advance in the generation of knowledge in this area of plant biology. Table 3 shows the effect on some of the components of the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species of pepper fruits exposed to enriched-NO atmospheres. The results show that the exogenous application of NO results in an improvement in the nutritional properties of the pepper, and therefore could be highly relevant for agri-food sector.

Table 12. Effect of an enriched-NO atmosphere on some components of the metabolism of ROS and RNS of pepper fruit. Arrows indicate how the parameters indicated in the table evolve during the fruit ripening, either increasing (↑) or decreasing (↓).

Components	Enriched-NO atmosphere
Ascorbate (Asa)	↑ 42 %
Galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH)	↑ 300 %
Ascorbate peroxidase (APX)	↑ 37%
Superoxide dismutase (SODs)	↑↑
Peroxidases (PODs)	↑↑
Dehydroascorbate reductase (DAR)	↑↑
Glutathione reductase (GR)	NE
Nitrosoglutathione reductase (GSNOR)	NE

NE, no effect

Overall, we could say that the ripening and post-harvest process in the pepper fruits would be regulated by the interaction between the RNS and the antioxidant systems, thus being able to establish a representative model of the metabolism that takes place during these processes, as it is shown in Figure 4.8 on this Memory.

In summary, this Thesis has contributed to the understanding of physiological processes such as ripening and post-harvest in the pepper fruits, as well as its interaction with RNS, contributing the following milestones:

- - Characterization for the first time of the antioxidant enzymes, catalase and Fe-SOD, during the ripening of the pepper fruits. In the case of catalase, it is

Discusión/ Discussion

remarkable that it displays atypical molecular characteristics compared to other plant species, what deserves to be studied in more depth.

- - During ripening several changes take place in the metabolism of NO, with a decrease in GSNOR activity and a concomitant increase of protein SNOs which could act as a NO reservoir.
- - Characterization of the enzyme galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) that catalyzes the last step of the ascorbate biosynthesis, as well as the identification of intermediate metabolites in the synthesis and degradation of ascorbate.
- - Peppers exposed to NO-enriched atmospheres have higher GalLDH activity and ascorbate content.

CONCLUSIONES
CONCLUSIONS

1. En esta Tesis Doctoral se muestra que durante la maduración del fruto de pimiento se produce un estrés oxidativo, caracterizado por una peroxidación lipídica moderada, lo cual podría ser debido a una modulación negativa de las enzimas implicadas en la eliminación del H_2O_2 celular, especialmente la catalasa. Estos datos, junto a otros previos que demostraban el incremento de la nitración de proteínas, fundamentalmente de la enzima catalasa, permiten concluir que durante la maduración de los frutos se produce un **estrés nitro-oxidativo**, donde el H_2O_2 y la catalasa son elementos claves. Considerando las propiedades moleculares de esta enzima en los frutos de pimiento, según se ha descrito en esta Memoria, nos hace pensar en que estudios moleculares y estructurales de la misma deberían ser un objetivo idóneo para futuras investigaciones.
2. Los frutos de pimiento presentan un alto contenido de ascorbato, que es uno de los antioxidantes no enzimáticos más importantes en plantas. En esta Tesis se han analizado dos enzimas implicadas en su metabolismo, la L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH), que cataliza la última etapa en la ruta de biosíntesis de ascorbato, y la ascorbato peroxidasa (APX) que lo utiliza para descomponer el H_2O_2 . Durante la maduración, la actividad de la GalLDH no sufre variaciones, posiblemente para mantener los niveles de producción de ascorbato. Sin embargo, la actividad APX aumenta, y probablemente podría compensar parcialmente la reducción observada de la actividad catalasa. Asimismo, durante la maduración también se produce un incremento de la actividad superóxido dismutasa (SOD), en concreto de la Fe-SOD que se localiza en los peroxisomas. Por tanto, estos datos sugieren que el metabolismo de las especies de oxígeno reactivo (ROS) participa activamente en la maduración de frutos de pimiento, donde componentes enzimáticos de los peroxisomas (catalasa y SODs) pueden jugar un papel esencial.
3. En estudios previos de nuestro grupo de investigación se ha descrito que el **óxido nítrico** (NO) disminuye durante la maduración del fruto de pimiento. En esta Tesis Doctoral se ha profundizado en el metabolismo de las especies de nitrógeno reactivo (RNS) en dicho proceso fisiológico y se comprobado que el contenido de nitrosotioles proteicos (SNOs) aumentaba, y que podrían actuar de

reservorio de NO. Por tanto, se puede concluir que el NO, junto con la enzima **nitrosoglutation reductasa** (GSNOR) están directamente implicados en la maduración de los frutos de pimiento.

4. Dentro de los estudios post-cosecha, los frutos de pimiento fueron expuestos a **atmósfera enriquecidas de NO**. Esto provocó un retraso en el proceso de maduración que fue acompañado con un incremento del contenido de ascorbato de aproximadamente un 40%. Así, nuestros datos permiten concluir que el NO aplicado exógenamente a los frutos de pimiento podría tener una doble repercusión en la industria agro-alimentaria, puesto que dicho gas alarga la conservación post-cosecha a la par que aumenta el contenido en ascorbato, lo que le daría un valor añadido a los frutos de pimiento.

CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral indican que parece existir una interacción finamente regulada entre las especies de nitrógeno reactivo y los antioxidantes enzimáticos de los frutos de pimiento que podría dirigir los procesos metabólicos que cursan durante la maduración. Este mecanismo podría ser reflejo de lo que ocurre en otras especies agrícolas lo que, dado en conocimiento que se ha generado en pimiento, permitiría usar sus frutos como un modelo donde poder establecer patrones metabólicos de maduración.

1. In this PhD Thesis an oxidative stress, characterized by a moderate lipid peroxidation, seems to occur during pepper fruit ripening, and this could be due to a negative modulation of the enzymes involved in the cell H_2O_2 removal, especially catalase. This, besides other data previously reported which demonstrated the increased protein nitration, mainly the enzyme catalase, allows concluding that during fruit ripening, a nitro-oxidative stress takes place, where H_2O_2 and catalase are key points. Taking into account the molecular properties of this enzyme in pepper fruits, as reported in this Memory, it makes us to believe that molecular and structural analyses of pepper catalase should be a target for future research.

2. Pepper fruits contain high ascorbate levels, as one of the most non-enzymatic antioxidants in plants. In this Thesis, two enzymes participating in its metabolism have been investigated, the L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH), which catalyses the last step of the ascorbate biosynthetic pathway, and the ascorbate peroxidase (APX) that uses it to scavenge H_2O_2 . During ripening, the GalLDH activity does not undergo variations, perhaps to maintain the levels of ascorbate production. Nevertheless, the APX activity increases, and possibly it could partially compensate the reduced catalase activity observed in this work. Likewise, an enhancement of superoxide dismutase (SOD) activity, basically that of the Fe-SOD, which localizes in peroxisomes, comes about. Therefore, these results suggest that the metabolism of reactive oxygen species (ROS) has an active role in the ripening of pepper fruits, where enzymatic members of peroxisomes (catalase and SOD) could be essential.

3. In previous research from our research group, it was reported that nitric oxide (NO) decreases at ripening in pepper fruits. In this PhD Thesis, we have deepened in the metabolism of reactive nitrogen species (RNS) during that physiological process and have proved that the protein nitrosothiols (SNOs) increased, what could be used as NO reservoir. Accordingly, we can conclude that NO, besides the nitroglutathione reductase (GSNOR) are directly involved in the ripening of pepper fruits.

4. Within the post-harvest studies carried out in this work, experiments where pepper fruits were subjected to NO-enriched atmospheres were performed. This promoted a delay of ripening which was accompanied by an increase of the

Conclusiones/ Conclusions

ascorbate content of about 40%. Thus, our data allow concluding that the NO exogenously applied to pepper fruits could have a double repercussion in the agro-food industry, since this gas lasts the post-harvest storing period at par that increases the ascorbate content what could provide an added value to pepper fruits.

OVERALL CONCLUSION

The results shown in this PhD Thesis suggest that a finely regulated interaction among the reactive nitrogen species and the enzymatic antioxidants seems to occur, and this could drive the metabolic processes taking place at ripening. This mechanism could be a mirror of what is happening in other crop species what, considering the knowledge generated in pepper, could allow using its fruits as model to establish metabolic patterns at ripening.

BIBLIOGRAFÍA
REFERENCES

- Aboobucker S.I. & Lorence A.** (2016) Recent progress on the characterization of aldolactone oxidoreductases. *Plant Physiology and Biochemistry* **98**, 171-185.
- Abreu I.A. & Cabelli D.E.** (2010) Superoxide dismutases - a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta* **1804**, 263-274.
- Ádám A.L., Bestwick C.S., Barna B. & Mansfield J.W.** (1995) Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Planta* **197**, 240-249.
- Aebi H.** (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105**, 121-126.
- Agius F., González-Lamothe R., Caballero J., Muñoz-Blanco J., Botella M. & Valpuesta V.** (2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology* **21**, 177-181.
- Ahn T., Schofield A. & Paliyath G.** (2002) Changes in antioxidant enzyme activities during tomato fruit development. *Physiology and Molecular Biology in Plants* **8**, 241-249.
- Airaki M., Sánchez-Moreno L., Leterrier M., Barroso J.B., Palma J.M. & Corpas F.J.** (2011) Detection and quantification of S-nitrosoglutathione (GSNO) in pepper (*Capsicum annuum* L.) plant organs by LC-ES/MS. *Plant & Cell Physiology* **52**, 2006-2015.
- Airaki M., Leterrier M., Mateos R.M., Valderrama R., Chaki M., Barroso J.B., del Río L.A., Palma J.M. & Corpas F.J.** (2012) Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant, Cell & Environment* **35**, 281-295.
- Airaki M., Leterrier M., Valderrama R., Chaki M., Begara-Morales J.C., Barroso J.B., del Río L.A., Palma J.M. & Corpas F.J.** (2015) Spatial and temporal regulation of the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species during the early development of pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings. *Annals of Botany* **116**, 679-693.
- Alderton W.K., Cooper C.E. & Knowles R.G.** (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* **357**, 593-615.
- Alhagdow M., Mounet F., Gilbert L., Nunes-Nesi A., Garcia V., Just D., Petit J., Beauvoit B., Fernie A., Rothan C. & Baldet P.** (2007) Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (L-GalLDH) affects plant and fruit development in tomato. *Plant Physiology* **145**, 1408-1422.
- Almansa M.S., Palma J.M., Yáñez J., Delrio L.A. & Sevilla F.** (1991) Purification of an iron-containing superoxide-dismutase from a citrus plant, *Citrus-limonum* R. *Free Radical Research Communications* **12-13**, 319-328.
- Alós E., Rodrigo M.J. & Zacarías L.** (2013) Transcriptomic analysis of genes involved in the biosynthesis, recycling and degradation of L-ascorbic acid in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science* **207**, 2-11.
- Alscher G.R., Erturk N. & Heath L.S.** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1331-1342.

Bibliografía/ References

- Álvarez de Morales M.P.** (2016) Procesos biológicos implicados en el control de la maduración y calidad de frutos de pimiento (*Capsicum Annuum* L.): Proteómica y antioxidantes. Tesis doctoral, 212 pp. Universidad de Granada, Granada.
- An H.M., Fan W.G., Chen L.G., Asghar S. & Liu Q.L.** (2007) Molecular characterisation and expression of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase and L-ascorbic acid accumulation during fruit development in *Rosa roxburghii*. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **82**, 627-635.
- Anand P., Kwak Y., Simha R. & Donaldson R.P.** (2009) Hydrogen peroxide induced oxidation of peroxisomal malate synthase and catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **491**, 25-31.
- Andrews J., Malone M., Thompson D.S., Ho L.C. & Burton K.S.** (2000) Peroxidase isozyme patterns in the skin of maturing tomato fruit. *Plant, Cell & Environment* **23**, 415-422.
- Anjum N.A., Umar S. & Chan M.T.** (2010) Ascorbate-glutathione pathway and stress tolerance in plants. Springer Science & Business Media. Dordrecht, The Netherlands, pp. 373-404.
- Anjum N.A., Sharma P., Gill S.S., Hasanuzzaman M., Khan E.A., Kachhap K., Mohamed A.A., Thangavel P., Devi G.D., Vasudhevan P., Sofu A., Khan N.A., Misra A.N., Lukatkin A.S., Singh H.P., Pereira E. & Tuteja N.** (2016) Catalase and ascorbate peroxidase-representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science Pollution Research* **23**, 19002-19029.
- Arabaci G.** (2011) Partial Purification and Some Properties of Catalase from Dill (*Anethum graveolens* L.). *Journal of Biology & Life Sciences* **2**, 11-15.
- Arnon D.I.** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* **24**, 1-15.
- Arrigoni O. & De Tullio M.C.** (2000) The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. *Journal of Plant Physiology* **157**, 481-488.
- Asada K., Kanematsu S., Okada S., Hayakawa T.** (1980) Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase. Bannister J.V and Hill H.A.O. Eds pp 136-153.
- Asada K.** (1992) Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* **85**, 235-241.
- Asada K.** (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* **141**, 391-396.
- Asensio A.C., Gil-Monreal M., Pires L., Gogorcena Y., Aparicio-Tejo P.M. & Morán J.F.** (2012) Two Fe-superoxide dismutase families respond differently to stress and senescence in legumes. *Journal of Plant Physiology* **169**, 1253-1260.
- Astier J., Rasul S., Koen E., Manzoor H., Besson-Bard A., Lamotte O., Jeandroz S., Durner J., Lindermayr C. & Wendehenne D.** (2011) S-nitrosylation: an emerging post-translational protein modification in plants. *Plant Science* **181**, 527-533.

- Astier J. & Lindermayr C.** (2012) Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 15193-15208.
- Astier J., Kulik A., Koen E., Besson-Bard A., Bourque S., Jeandroz S., Lamotte O. & Wendehenne D.** (2012a) Protein S-nitrosylation: what's going on in plants? *Free Radical Biology and Medicine* **53**, 1101-1110.
- Astier J., Besson-Bard A., Lamotte O., Bertoldo J., Bourque S., Terenzi H. & Wendehenne D.** (2012b) Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation in cryptogein signalling in tobacco cells. *Biochemical Journal* **447**, 249-260.
- Badejo A., Eltelib H., Fukunaga K., Fujikawa Y. & Esaka M.** (2009) Increase in ascorbate content of transgenic tobacco plants overexpressing the acerola (*Malpighia glabra*) phosphomannomutase gene. *Plant & Cell Physiology* **50**, 423-428.
- Badejo A.A., Wada K., Gao Y., Maruta T., Sawa Y., Shigeoka S. & Ishikawa T.** (2012) Translocation and the alternative D-galacturonate pathway contribute to increasing the ascorbate level in ripening tomato fruits together with the D-mannose/L-galactose pathway. *Journal Experimental Botany* **63**, 229-239.
- Baker A. & Graham I.A.** (2013) Plant peroxisomes: biochemistry, cell biology and biotechnological applications. Springer Science & Business Media.pp.505.
- Baker P.R., Schopfer F.J., O'Donnell V.B. & Freeman B.A.** (2009) Convergence of nitric oxide and lipid signaling: anti-inflammatory nitro-fatty acids. *Free Radical Biology & Medicine* **46**, 989-1003.
- Ball L., Accotto G.P., Bechtold U., Creissen G., Funck D., Jimenez A., Kular B., Leyland N., Mejia-Carranza J., Reynolds H., Karpinski S. & Mullineaux P.M.** (2004) Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 2448-2462.
- Banaras M., Boslandand P.W. & Lownds N.K.** (2005) Effects of harvest time and growth conditions on storage and post-storage quality of fresh peppers (*Capsicum annuum* L). *Pakistan Journal of Botany* **37**, 337-344.
- Barroso J.B., Corpas F.J., Carreras A., Sandalio L.M., Valderrama R., Palma J.M., Lupiáñez J.A. & del Río L.A.** (1999) Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 36729-36733.
- Barroso J.B., Corpas F.J., Carreras A., Rodríguez-Serrano M., Esteban F.J., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Romero-Puertas M.C., Valderrama R., Sandalio L.M. & del Río L.A.** (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1785-1793.
- Barroso J.B., Valderrama R. & Corpas F.J.** (2013) Immunolocalization of S-nitrosoglutathione, S-nitrosoglutathione reductase and tyrosine nitration in pea leaf organelles. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**, 2635-2640.

Bibliografía/ References

- Barth C., De Tullio M. & Conklin P.L.** (2006) The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1657-1665.
- Bartoli C.G., Pastori G.M. & Foyer C.H.** (2000) Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiology* **123**, 335-344.
- Bartoli C.G., Yu J., Gómez F., Fernández L., McIntosh L. & Foyer C.H.** (2006) Interrelationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1621-1631.
- Bartoli C.G., Senn M.E. & Gergoff Grozeff G.E.** (2016) Physiological Processes Contributing to the Synthesis of Ascorbic Acid in Plants. In: Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses (eds. by Gupta DK, Palma JM & Corpas FJ), pp. 71-92. Springer International Publishing.
- Bayoumi Y.A.** (2008) Improvement of postharvest keeping quality of white pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) by hydrogen peroxide treatment under storage conditions. *Acta Biologica Szegediensis* **52**, 7-15.
- Beauchamp C. & Fridovich I.** (1971) Superoxide dismutase. Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**, 276-287.
- Begara-Morales J.C., Chaki M., Sánchez-Calvo B., Mata-Pérez C., Leterrier M., Palma J.M., Barroso J.B. & Corpas F.J.** (2013) Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence. *Journal of Experimental Botany* **64**, 1121-1134.
- Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Valderrama R., Mata-Pérez C., López-Jaramillo J., Padilla M.N., Carreras A., Corpas F.J. & Barroso J.B.** (2014) Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* **65**, 527-538.
- Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Mata-Pérez C., Valderrama R., Padilla M.N., López-Jaramillo J., Luque F., Corpas F.J. & Barroso J.B.** (2015) Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* **66**, 5983-5996.
- Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Valderrama R., Mata-Pérez C., Padilla M.N., Corpas F.J. & Barroso J.B.** (2016) Antioxidant Systems are Regulated by Nitric Oxide-Mediated Post-translational Modifications (NO-PTMs). *Frontiers in Plant Science* **7**, 1-8.
- Benhar M., Forrester M.T. & Stamler J.S.** (2009) Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Natural Reviews. Molecular Cell Biology* **10**, 721-732.
- Besson-Bard A., Pugin A. & Wendehenne D.** (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 21-39.
- Besson-Bard A., Gravot A., Richaud P., Auroy P., Duc C., Gaymard F., Tacconat L., Renou J.P., Pugin A. & Wendehenne D.** (2009) Nitric oxide contributes to cadmium

- toxicity in Arabidopsis by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology* **149**, 1302-1315.
- Bieker S., Riester L., Stahl M., Franzaring J. & Zentgraf U.** (2012) Senescence-specific Alteration of Hydrogen Peroxide Levels in *Arabidopsis thaliana* and Oilseed Rape Spring Variety *Brassica napus* L. cv. MozartF. *Journal of Integrative Plant Biology* **54**, 540-554.
- Birt D.F. & Jeffery E.** (2013) Flavonoids. *Advances in Nutrition* **4**, 576-577.
- Blaschke K., Ebata K.T., Karimi M.M., Zepeda-Martínez J.A., Goyal P., Mahapatra S., Tam A., Laird D.J., Hirst M. & Rao A.** (2013) Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature* **500**, 222-226.
- Bouvier F., Keller Y., d'Harlingue A. & Camara B.** (1998) Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Biochimica et Biophysica Acta* **1391**, 320-328.
- Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M., Inzé D. & Asada K.** (1994) Superoxide Dismutase in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**, 199-218.
- Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Bridges S.M. & Salin A.** (1981) Distribution of Iron-containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant Physiology*. **68**, 275-278.
- Bright J., Desikan R., Hancock J.T., Weir I.S. & Neill S.J.** (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal* **45**, 113-122.
- Broniowska K.A., Diers A.R. & Hogg N.** (2013) S-nitrosoglutathione. *Biochimica et Biophysica Acta* **1830**, 3173-3181.
- Brummell D.A., Dal Cin V., Crisosto C.H. & Labavitch J.M.** (2004) Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2029-2039.
- Buege J.A. & Aust S.D.** (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* **52**, 302-310.
- Bueno P., Varela J., Giménez-Gallego G. & del Río L.A.** (1995) Peroxisomal Copper Zinc Superoxide dismutase. Characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons. *Plant Physiology* **108**, 1151-1160.
- Bunkelmann J.R. & Trelease R.N.** (1996) Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiology* **110**, 589-598.
- Chaki M., Fernández-Ocaña A.M., Valderrama R., Carreras A., Esteban F.J., Luque F., Gómez-Rodríguez M.V., Begara-Morales J.C., Corpas F.J. & Barroso J.B.** (2009a) Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant & Cell Physiology* **50**, 265-279.

Bibliografía/ References

- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocana A.M., Carreras A., López-Jaramillo J., Luque F., Palma J.M., Pedrajas J.R., Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Gómez-Rodríguez M.V., Corpas F.J. & Barroso J.B.** (2009b) Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *Journal of Experimental Botany* **60**, 4221-4234.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A.M., Carreras A., Gómez-Rodríguez M.V., López-Jaramillo J., Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Luque F., Leterrier M., Corpas F.J. & Barroso J.B.** (2011a) High temperature triggers the metabolism of S-nitrosothiols in sunflower mediating a process of nitrosative stress which provokes the inhibition of ferredoxin-NADP reductase by tyrosine nitration. *Plant, Cell & Environment* **34**, 1803-1818.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A.M., Carreras A., Gómez-Rodríguez M.V., Pedrajas J.R., Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Luque F., Leterrier M., Corpas F.J. & Barroso J.B.** (2011b) Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1803-1813.
- Chaki M., Álvarez de Morales P., Ruíz C., Begara-Morales J.C., Barroso J.B., Corpas F.J. & Palma J.M.** (2015) Ripening of pepper (*Capsicum annuum*) fruit is characterized by an enhancement of protein tyrosine nitration. *Annals of Botany* **116**, 637-647.
- Cheeseman J.M.** (2007) Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship. *Plant Stress* **1**, 4-15.
- Chen G.X. & Asada K.** (1989) Ascorbate Peroxidase in Tea Leaves: Occurrence of Two Isozymes and the Differences in Their Enzymatic and Molecular Properties. *Plant and Cell Physiology* **30**, 987-998.
- Cheng G., Yang E., Lu W., Jia Y., Jiang Y. & Duan X.** (2009) Effect of nitric oxide on ethylene synthesis and softening of banana fruit slice during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 5799-5804.
- Chen Z. & Gallie D.R.** (2004) The Ascorbic Acid Redox State Controls Guard Cell Signaling and Stomatal Movement. *The Plant Cell* **16**, 1143-1162.
- Clare D.A., Duong M.N., Darr D., Archibald F. & Fridovich I.** (1984) Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase. *Analytical Biochemistry* **140**, 532-537.
- Clark D., Durner J., Navarre D.A. & Klessig D.F.** (2000) Nitric Oxide Inhibition of Tobacco Catalase and Ascorbate Peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 1380-1384.
- Cochran H.L.** (1938) A morphological study of flower and seed development in pepper. *Journal of Agricultural Research* **56**, 395-419.
- Collins A.R.** (2001) Carotenoids and genomic stability. *Mutation Research* **475**, 21-28.

- Conklin P., Norris S., Wheeler G., Williams E., Smirnoff N. & Last R.** (1999) Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Science USA (PNAS)* **96**, 4198-4203.
- Conklin P.L.** (2001) Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant, Cell & Environment* **24**, 383-394.
- Conklin P.L. & 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 & Environment* **27**, 959-970.
- Conklin P., Gatzek S., Wheeler G., Dowdle J., Raymond M., Rolinski S., Isupov M., Littlechild J. & Smirnoff N.** (2006) Arabidopsis thaliana VTC4 encodes L-galactose-1-P phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 15662-15670.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M., Distefano S., Palma J.M., Lupiáñez J.A. & del Río L.A.** (1998a) A dehydrogenase-mediated recycling system of NADPH peroxisomes. *Biochemical Journal* **330**, 777-784.
- Corpas F.J., Sandalio L.M., del Río L. & Trelease R.N.** (1998b) Copper-Zinc superoxide dismutase is a constituent enzyme of the matrix of peroxisomes in cotyledons of oilseed plants. *New Phytologist*. **138**, 307-314.
- Corpas F.J., Palma J.M., Sandalio L.M., López-Huertas E., Romero-Puertas M.C., Barroso J.B. & del Río L.A.** (1999) Purification of catalase from pea leaf peroxisomes: identification of five different isoforms. *Free Radical Research* **31**, 235-241.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Quirós M., León A.M., Romero-Puertas M.C., Esteban F.J., Valderrama R., Palma J.M., Sandalio L.M., Gómez M. & del Río L.A.** (2004) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiology* **136**, 2722-2733.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Valderrama R., Palma J.M., León A.M., Sandalio L.M. & del Río L.A.** (2006a) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* **224**, 246-254.
- Corpas F.J., Fernández-Ocaña A., Carreras A., Valderrama R., Luque F., Esteban F.J., Rodríguez-Serrano M., Chaki M., Pedrajas J.R., Sandalio L.M., del Río L.A. & Barroso J.B.** (2006b) The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant & Cell Physiology* **47**, 984-994.
- Corpas F.J., Carreras A., Valderrama R., Chaki M., Palma J.M., del Río L.A. & Barroso J.B.** (2007a) Reactive Nitrogen Species and Nitrosative Stress In Plants. *Plant Stress* **1**, 37-41.
- Corpas F.J., del Río L.A. & Barroso J.B.** (2007b) Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends in Plant Science* **12**, 436-438.

Bibliografía/ References

- Corpas F.J., Palma J.M., Sandalio L.M., Valderrama R., Barroso J.B. & del Río L.A.** (2008a) Peroxisomal xanthine oxidoreductase: characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology* **165**, 1319-1330.
- Corpas F.J., Chaki M., Fernández-Ocaña A., Valderrama R., Palma J.M., Carreras A., Begara-Morales J.C., Airaki M., del Río L.A. & Barroso J.B.** (2008b) Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant & Cell Physiology* **49**, 1711-1722.
- Corpas F.J., del Río L.A. & Barroso J.B.** (2008c) Post-translational modifications mediated by reactive nitrogen species: Nitrosative stress responses or components of signal transduction pathways? *Plant Signaling & Behavior* **3**, 301-303.
- Corpas F.J., Palma J.M., del Río L.A. & Barroso J.B.** (2009a) Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytologist* **184**, 9-14.
- Corpas F.J., Chaki M., Leterrier M. & Barroso J.B.** (2009b) Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 920-923.
- Corpas F.J., Leterrier M., Valderrama R., Airaki M., Chaki M., Palma J.M. & Barroso J.B.** (2011) Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science* **181**, 604-611.
- Corpas F.J., Alche J.D. & Barroso J.B.** (2013a) Current overview of S-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants. *Frontiers in Plant Science* **4**, 1-3.
- Corpas F.J., Palma J.M., del Río L.A. & Barroso J.B.** (2013b) Protein tyrosine nitration in higher plants grown under natural and stress conditions. *Frontiers in Plant Science* **4**, 1-4.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Palma J.M., del Río L.A.** (2013c) Peroxisomes as Cell Generators of Reactive Nitrogen Species (RNS) Signal Molecules. *Subcellular Biochemistry* **69**, 283-293.
- Corpas F.J. & Barroso J.B.** (2014) NADPH-generating dehydrogenases: their role in the mechanism of protection against nitro-oxidative stress induced by adverse environmental conditions. *Frontiers in Environmental Science* **2**, 1-5.
- Corpas F.J. & Barroso J.B.** (2014) Peroxynitrite (ONOO) is endogenously produced in arabidopsis peroxisomes and is overproduced under cadmium stress. *Annals of Botany* **113**, 87-96.
- Corpas F.J.** (2015) What is the role of hydrogen peroxide in plant peroxisomes? *Plant Biology* **17**, 1099-1103.
- Corpas F.J. & Barroso J.B.** (2015) Nitric oxide from a “green” perspective. *Nitric Oxide* **45**, 15-19.

- Corpas F.J., Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Chaki M. & Barroso J.B.** (2015a) Nitration and S-Nitrosylation: two post-translational modifications (PTMs) mediated by reactive nitrogen species (RNS) and their role in signalling processes of plant cells. In: *Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants* (eds. by Gupta KJ & Igamberdiev AU), pp. 267-281. Springer International Publishing, Cham.
- Corpas F.J., Gupta D.K. & Palma J.M.** (2015b) Production sites of reactive oxygen species (ROS) in organelles from plant cells. In: *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress* (eds. by Gupta DK, Palma JM & Corpas FJ), pp. 1-22. Springer International Publishing, Cham.
- Corpas F.J. & Barroso J.B.** (2016) Lead-induced stress, which triggers the production of nitric oxide (NO) and superoxide anion (O_2^-) in Arabidopsis peroxisomes, affects catalase activity. *Nitric Oxide*, 1-8.
- Corpas F.J., Palma J.M., del Río L.A. & Barroso J.B.** (2016) Nitric Oxide Emission and Uptake from Higher Plants. In: *Gasotransmitters in Plants: The Rise of a New Paradigm in Cell Signaling* (eds. by Lamattina L & García-Mata C), pp. 79-93. Springer International Publishing, Cham.
- Corpas F.J.** (2017) Reactive Nitrogen Species (RNS) in Plants Under Physiological and Adverse Environmental Conditions: Current View. In: *Progress in Botany* (eds. by Cánovas FM, Lüttge U & Matyssek R), pp. 97-119. Springer International Publishing, Cham.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Palma J.M. & Rodríguez-Ruíz M.** (2017) Plant peroxisomes: A nitro-oxidative cocktail. *Redox Biology* **11**, 535-542.
- Cosio C. & Dunand C.** (2009) Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany* **60**, 391-408.
- Cronje C., George G.M., Fernie A.R., Bekker J., Kossmann J. & Bauer R.** (2012) Manipulation of L-ascorbic acid biosynthesis pathways in *Solanum lycopersicum*: elevated GDP-mannose pyrophosphorylase activity enhances L-ascorbate levels in red fruit. *Planta* **235**, 553-564.
- Csiszár J., Gallé Á., Horváth E., Dancsó P., Gombos M., Váry Z., Erdei L., Györgyey J. & Tari I.** (2012) Different peroxidase activities and expression of abiotic stress-related peroxidases in apical root segments of wheat genotypes with different drought stress tolerance under osmotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **52**, 119-129.
- Csóka M., Amtmann M., Nemes K. & Korány K.** (2013) Comparison of the aroma properties of red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars grown in Hungary. *Acta Alimentaria* **42**, 143-157.
- Cuadra-Crespo P. & del Amor F.M.** (2010) Effects of postharvest treatments on fruit quality of sweet pepper at low temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 2716-2722.

Bibliografía/ References

- Dalton D.A., Baird L.M., Langeberg L., Taugher C.Y., Anyan W.R., Vance C.P. & Sarath G.** (1993) Subcellular Localization of Oxygen Defense Enzymes in Soybean (*Glycine max* L. Merr.) Root Nodules. *Plant Physiology* **102**, 481-489.
- Davey M., Van Montagu M., Inze D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie I., Strain J., Favell D. & Fletcher J.** (2000) Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the science of food and agriculture* **80**, 825-860.
- Davies B.H.** (1976) Carotenoids. In: Goodwin TW (Ed) Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments 38-165
- De Gara L.** (2004) Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. *Phytochemistry Reviews* **3**, 195-205.
- De Leonardis S., Dipierro N. & Dipierro S.** (2000) Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 773-779.
- De Michele R., Vurro E., Rigo C., Costa A., Elviri L., Di Valentin M., Careri M., Zottini M., Sanita di Toppi L. & Lo Schiavo F.** (2009) Nitric oxide is involved in cadmium-induced programmed cell death in Arabidopsis suspension cultures. *Plant Physiology* **150**, 217-228.
- De Tullio M.C., Paciolla C., Dalla Vecchia F., Rascio N., D'Emérico S., De Gara L., Liso R. & Arrigoni O.** (1999) Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta* **209**, 424-434.
- De Tullio M.C., Liso R. & Arrigoni O.** (2004) Ascorbic Acid Oxidase: An Enzyme in Search of a Role. *Biologia Plantarum* **48**, 161-166.
- DeBolt S., Cook D. & Ford C.** (2006) L-Tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Science (PNAS)* **103**, 5608 - 5613.
- DeBolt S., Melino V. & Ford C.** (2007) Ascorbate as a biosynthetic precursor in plants. *Annals of Botany* **99**, 3-8.
- del Río L.A., Lyon D., Olah I., Glick B. & Salin M.** (1983) Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. *Planta* **158**, 216-224.
- del Río L.A., Sandalio L.M., Palma J.M., Bueno P. & Corpas F.J.** (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biology & Medicine* **13**, 557-580.
- del Río L.A., Pastori G.M., Palma J.M., Sandalio L.M., Sevilla F., Corpas F.J., Jiménez A., López-Huertas E. & Hernández J.A.** (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology* **116**, 1195-200.

- del Río L.A., Sandalio L.M., Altomare D.A. & Zilinskas B.A.** (2003a) Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **54**, 923-933.
- del Río L.A., Corpas F.J., Sandalio L.M., Palma J.M. & Barroso J.B.** (2003b) Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. *International union of biochemistry and molecular biology (IUBMB)* **55**, 71-81.
- del Río L.A., Corpas F.J. & Barroso J.B.** (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**, 783-92.
- del Río L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Palma J.M. & Barroso J.B.** (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* **141**, 330-335.
- del Río L.A.** (2011) Peroxisomes as a cellular source of reactive nitrogen species signal molecules. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **506**, 1-11.
- De Río L.A.** (2013) Peroxisomes and their key role in cellular signalling and metabolism. Berlin, Heidelberg:Springer-Verlag. 1-352
- del Río L.A.** (2015) ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of experimental Botany* **66**, 2827-2837.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A. & Lamb C.** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588
- DeWitt D. & Bosland P.W.** (1993) The Pepper Garden. Gardening guide. Berkeley, CA: Ten Speed Press.
- DeWitt D. & Bosland P.W.** (1996) Peppers of the World: An Identification Guide. Berkeley, CA: Ten Speed Press.
- do Nascimento J.R.O., Higuchi B.K., Gómez M.L.P.A., Oshiro R.A. & Lajolo F.M.** (2005) L-Ascorbate biosynthesis in strawberries: L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase expression during fruit development and ripening. *Postharvest Biology and Technology* **38**, 34-42.
- Domingos P., Prado A.M., Wong A., Gehring C. & Feijo J.A.** (2015) Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants. *Molecular Plant* **8**, 506-520.
- Dowdle J., Ishikawa T., Gatzek S., Rolinski S. & Smirnoff N.** (2007) Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *The Plant Journal* **52**, 673-689.
- Droillard M.J. & Paulin A.** (1990) Isoenzymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiology*. **94**, 1187-1192.

Bibliografía/ References

- Edwards E.A., Rawsthorne S. & Mullineaux P.M.** (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **180**, 278-284.
- Eising R., Trelease R.N. & Ni W.T.** (1990) Biogenesis of catalase in glyoxysomes and leaf-type peroxisomes of sunflower cotyledons. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **278**, 258-264.
- Endo H. & Imahori Y.** (2016) Changes in hydrogen peroxide and superoxide anion contents and superoxide dismutase activity during the maturation of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit. In: *XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes* (eds. by Golding JB, Heyes JA, Toivonen PMA, Avanzato D & Harker R), pp. 399-404.
- Endres S. & Tenhaken R.** (2009) myo-Inositol oxygenase controls the level of myo-inositol in *Arabidopsis* but does not increase ascorbic acid. *Plant Physiology* **149**, 1042 - 1049.
- Erickson A.N. & Markhart A.H.** (2001) Flower production, fruit set, and physiology of bell pepper during elevated temperature and vapor pressure deficit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **126**, 697-702.
- Erickson A.N. & Markhart A.H.** (2002) Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. *Plant, Cell & Environment* **25**, 123-130.
- Espunya M.C., Díaz M., Moreno-Romero J. & Martínez M.C.** (2006) Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. *Plant, Cell and Environment* **29**, 1002-1011.
- Espunya M.C., De Michele R., Gómez-Cadenas A. & Martínez M.C.** (2012) S-Nitroglutathione is a component of wound- and salicylic acid-induced systemic responses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3219-3227.
- Estrada B., Bernal M.A., Díaz J., Pomar F. & Merino F.** (2002) Capsaicinoids in vegetative organs of *Capsicum annuum* L. in relation to fruiting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 1188-1191.
- Fan H., Du C., Xu Y. & Wu X.** (2014) Exogenous nitric oxide improves chilling tolerance of Chinese cabbage seedlings by affecting antioxidant enzymes in leaves. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* **55**, 159-165.
- Fawal N., Li Q., Savelli B., Brette M., Passaia G., Fabre M., Mathe C. & Dunand C.** (2013) PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. *Nucleic Acids Research* **41**, 441-444.
- Feechan A., Kwon E., Yun B.-W., Wang Y., Pallas J.A. & Loake G.J.** (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 8054-8059.

- Fernández-Ocaña A., Chaki M., Luque F., Gómez-Rodríguez M.V., Carreras A., Valderrama R., Begara-Morales J.C., Hernández L.E., Corpas F.J. & Barroso J.B.** (2011) Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions. Identification of two new genes of mitochondrial Mn-SOD. *Journal of Plant Physiology* **168**, 1303-1308.
- Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Calo G., Salerno G. & Lamattina L.** (2010) Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* **22**, 3816-3830.
- Foresi N., Mayta M.L., Lodeyro A.F., Scuffi D., Correa-Aragunde N., García-Mata C., Casalongue C., Carrillo N. & Lamattina L.** (2015) Expression of the tetrahydrofolate-dependent nitric oxide synthase from the green alga *Ostreococcus tauri* increases tolerance to abiotic stresses and influences stomatal development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **82**, 806-821.
- Foster M.W., McMahon T.J. & Stamler J.S.** (2003) S-nitrosylation in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* **9**, 160-168.
- Fox A., Del Pozo-Insfran D., Lee J.H, Sargent S. & Talcote S.** (2005) Ripening-induced chemical and antioxidant changes in bell peppers as affected by harvest maturity and postharvest ethylene exposure. *Hortscience* **40**, 732-736.
- Foyer C.H. & Halliwell B.** (1977) Purification and properties of dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Phytochemistry* **16**, 1347-1350.
- Foyer C.H., Lopez-Delgado H., Dat J.F. & Scott I.M.** (1997) Hydrogen peroxide-and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* **100**, 241-254.
- Foyer C.H. & Noctor G.** (2005a) Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *Plant Cell* **17**, 1866-1875.
- Foyer C.H. & Noctor G.** (2005b) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* **28**, 1056-71.
- Foyer C.H. & Noctor G.** (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & Redox Signaling* **11**, 861-905.
- Foyer C.H. & Noctor G.** (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* **155**, 2-18.
- Foyer C.H. & Noctor G.** (2013) Redox signaling in plants. *Antioxid Redox Signal* **18**, 2087-2090.
- Franceschi V. & Tarlyn N.** (2002) L-Ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiology* **130**, 649 - 656.
- Francoz E., Ranocha P., Nguyen-Kim H., Jamet E., Burlat V. & Dunand C.** (2015) Roles of cell wall peroxidases in plant development. *Phytochemistry* **112**, 15-21.

Bibliografía/ References

- Freschi L.** (2013) Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science* **4**, 1-22.
- Fridovich I.** (1975) Superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* **44**, 147-159.
- Fridovich I.** (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **247**, 1-11.
- Frugoli J.A., Zhong H.H., Nuccio M.L., McCourt P., McPeck M.A., Thomas T.L. & McClung C.R.** (1996) Catalase Is Encoded by a Multigene Family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* **112**, 327-336.
- Gallie D.R.** (2013) The role of l-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of Experimental Botany* **64**, 433-443.
- Garcés-Claver A., Gil-Ortega R., Álvarez-Fernández A. & Arnedo-Andrés M.S.** (2007) Inheritance of capsaicin and dihydrocapsaicin, determined by HPLC-ESI/MS, in an intraspecific cross of *Capsicum annuum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 6951-6957.
- Gautier H., Massot C., Stevens R., Sérino S. & Génard M.** (2009) Regulation of tomato fruit ascorbate content is more highly dependent on fruit irradiance than leaf irradiance. *Annals of Botany* **103**, 495-504.
- Gautier H., Massot C., Bancel D. & Stevens R.** (2013) Light and temperature of ripening tomato fruits interact to regulate ascorbate synthesis, oxidation and recycling. In: 11th International conference on reactive oxygen and nitrogen species in plants. *Journal of Biotechnology computational and bionanotechnology* **94**, 156-202.
- Gest N., Garchery C., Gautier H., Jiménez A. & Stevens R.** (2013a) Light-dependent regulation of ascorbate in tomato by a monodehydroascorbate reductase localized in peroxisomes and the cytosol. *Plant Biotechnology Journal* **11**, 344-354.
- Gest N., Gautier H. & Stevens R.** (2013b) Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *Journal of Experimental Botany* **64**, 33-53.
- Giambanco de Ena H.** (2006) Pimientos. Ediciones de Horticultura. Compendio de Horticultura 16. 119-129.
- Gill S.S. & Tuteja N.** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 909-930.
- Gill S.S., Anjum N.A., Hasanuzzaman M., Gill R., Trivedi D.K., Ahmad I., Pereira E. & Tuteja N.** (2013) Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry* **70**, 204-212.
- Gómez J.M., Hernández J.A., Jiménez A., del Río L.A. & Sevilla F.** (1999) Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Radical Research* **31**, 11-18.

- Gómez J.M., Jiménez A., Olmos E., Sevilla F.** (2004) Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* **55**, 119-130.
- Gómez-García M. & Ochoa-Alejo N.** (2013) Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum* spp.). *International Journal of Molecular Science* **14**, 19025-19053.
- Gorren A.C., Schrammel A., Schmidt K. & Mayer B.** (1996) Decomposition of S-nitrosoglutathione in the presence of copper ions and glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **330**, 219-228.
- Gow A.J., Farkouh C.R., Munson D.A., Posencheg M.A. & Ischiropoulos H.** (2004) Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American Journal of Physiology, Lung Cellular and Molecular Physiology* **287**, 262-268.
- Green M. & Fry S.** (2005) Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature* **433**, 83 - 87.
- Groß F., Durner J. & Gaupels F.** (2013) Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in Plant Science* **4**, 1-15.
- Groß F., Rudolf E.E., Thiele B., Durner J. & Astier J.** (2017) Copper amine oxidase 8 regulates arginine-dependent nitric oxide production in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*.3-14
- Grun S., Lindermayr C., Sell S. & Durner J.** (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**, 507-516.
- Guerra D., Ballard K., Truebridge I. & Vierling E.** (2016) S-Nitrosation of Conserved Cysteines Modulates Activity and Stability of S-Nitrosoglutathione Reductase (GSNOR). *Biochemistry* **55**, 2452-2464.
- Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M. & Van Dongen J.T.** (2011) On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* **16**, 160-168.
- Gutteridge J.M. & Halliwell B.** (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences* **899**, 136-147.
- Halliwell B. & Foyer C.H.** (1976) Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical. *Biochemical Journal* **155**, 697-700.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M.** (1985) Free radicals in biology and medicine. *Journal of free radicals in biology & medicine* **1**, 331-332.
- Halliwell B.** (2006) Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology* **141**, 312-322.
- Halliwell B.** (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* **35**, 1147-1150.
- Hancock R.D. & Viola R.** (2005) Biosynthesis and Catabolism of L-Ascorbic Acid in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**, 167-188.

- Hausladen A. & Stamler J.S.** (1999) Nitrosative stress. *Methods in Enzymology* **300**, 389-395.
- Heazlewood J.L., Tonti-Filippini J.S., Gout A.M., Day D.A., Whelan J. & Millar A.H.** (2004) Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* **16**, 241-256.
- Hedrick J.L. & Smith A.J.** (1968) Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **126**, 155-164.
- Heinze M. & Gerhardt B.** (2002) Plant Catalases. In: *Plant Peroxisomes: Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications* (eds. by Baker A & Graham IA), pp. 103-40. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Hervás M., Bashir Q., Leferink N.G.H., Ferreira P., Moreno-Beltrán B., Westphal A.H., Díaz-Moreno I., Medina M., de la Rosa M.A., Ubbink M., Navarro J.A. & van Berkel W.J.H.** (2013) Communication between L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase and cytochrome c. *The FEBS Journal* **280**, 1830-1840.
- Heukeshoven J. & Dernick R.** (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6**, 103-112.
- Holmes A.J. & Williams D.L.H.** (2000) Reaction of ascorbic acid with S-nitrosothiols: clear evidence for two distinct reaction pathways. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1639-1644.
- Holzmeister C., Gaupels F., Geerlof A., Sarioglu H., Sattler M., Durner J. & Lindermayr C.** (2015) Differential inhibition of Arabidopsis superoxide dismutases by peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Journal of Experimental Botany* **66**, 989-999.
- Horemans N., Foyer C., Potters G. & Asard H.** (2000a) Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 531-540.
- Horemans N., Foyer C.H. & Asard H.** (2000b) Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science* **5**, 263-267.
- Hormaetxe K., Hernández A., Becerril J.M. & García-Plazaola J.I.** (2004) Role of red carotenoids in photoprotection during winter acclimation in Buxus sempervirens leaves. *Plant Biology* **6**, 325-332.
- Hornero-Méndez D. & Mínguez-Mosquera M.I.** (2000) Xanthophyll esterification accompanying carotenoid overaccumulation in chromoplast of *Capsicum annuum* ripening fruits is a constitutive process and useful for ripeness index. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 1617-1622.
- Hornero-Méndez D., Gómez-Ladrón De Guevara R. & Mínguez-Mosquera M.I.** (2000) Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars during ripening. Cultivar selection for breeding. *Journal of Agricultura and Food Chemistry* **48**, 3857-3864.

- Hossain M.A. & Asada K.** (1984) Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. *Plant & Cell Physiology* **25**, 1285-1295.
- Houmani H., Rodríguez-Ruíz M., Palma J.M., Abdelly C. & Corpas F.J.** (2016) Modulation of superoxide dismutase (SOD) isozymes by organ development and high long-term salinity in the halophyte *Cakile maritima*. *Protoplasma* **253**, 885-894.
- Howard L.R. & Hernández-Brenes C.** (1998) Antioxidant content and market quality of jalapeno pepper rings as affected by minimal processing and modified atmosphere packaging. *Journal of Food Quality* **21**, 317-327.
- Howard L.R., Talcott S.T., Brenes C.H. & Villalon B.** (2000) Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* Species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultura and Food Chemistry* **48**, 1713-1720.
- Hu J., Baker A., Bartel B., Linka N., Mullen R.T., Reumann S. & Zolman B.K.** (2012) Plant peroxisomes: biogenesis and function. *Plant Cell* **24**, 2279-2303.
- Hu Y.Q., Liu S., Yuan H.M., Li J., Yan D.W., Zhang J.F. & Lu Y.T.** (2010) Functional comparison of catalase genes in the elimination of photorespiratory H₂O₂ using promoter- and 3'-untranslated region exchange experiments in the Arabidopsis cat2 photorespiratory mutant. *Plant, Cell & Environment* **33**, 1656-1670.
- Huan C., Jiang L., An X., Yu M., Xu Y., Ma R. & Yu Z.** (2016) Potential role of reactive oxygen species and antioxidant genes in the regulation of peach fruit development and ripening. *Plant Physiology and Biochemistry* **104**, 294-303.
- Imai T., Karita S., Shiratori G.-i., Hattori M., Nunome T., Ôba K. & Hirai M.** (1998) L-Galactono- γ -lactone Dehydrogenase from Sweet Potato: Purification and cDNA Sequence Analysis. *Plant and Cell Physiology* **39**, 1350-1358.
- Imai T., Ban Y., Terakami S., Yamamoto T. & Moriguchi T.** (2009) L-Ascorbate biosynthesis in peach: cloning of six L-galactose pathway-related genes and their expression during peach fruit development. *Physiologia Plantarum* **136**, 139-149.
- Ischiropoulos H. & Gow A.** (2005) Pathophysiological functions of nitric oxide-mediated protein modifications. *Toxicology* **208**, 299-303.
- Ishikawa K.** (2003) Biosynthesis of capsaicinoids in *Capsicum*. In: *Capsicum: the genus Capsicum* (ed. by De A K), pp. 87-95.
- Ishikawa T., Sakai K., Yoshimura K., Takeda T. & Shigeoka S.** (1996) cDNAs encoding spinach stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidase, differing in the presence or absence of their 3'-coding regions. *FEBS Letters* **384**, 289-293.
- Ishikawa T., Dowdle J. & Smirnoff N.** (2006) Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiologia Plantarum* **126**, 343-355.
- Jeandroz S., Wipf D., Stuehr D.J., Lamattina L., Melkonian M., Tian Z., Zhu Y., Carpenter E.J., Wong G.K. & Wendehenne D.** (2016) Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Science Signaling* **9**, 1-10.

Bibliografía/ References

- Jiménez A., Hernández J.A., del Río L.A. & Sevilla F.** (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves In: *Plant Physiology* **114**, 275-284.
- Jiménez A., Hernández J.A., del Río L.A. & Sevilla F.** (1998) Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisome in the senescence of pea leaves *Plant and Cell Physiology* **118**, 1327-1335.
- Jiménez A., Creissen G., Kular B., Firmin J., Robinson S., Verhoeyen M. & Mullineaux P.** (2002) Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta* **214**, 751-758.
- Jiménez A., Gómez J.M., Navarro E. & Sevilla F.** (2002) Changes in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 515-520.
- Jiménez A., Romojaro F., Gómez J.M., Llanos M.R. & Sevilla F.** (2003) Antioxidant Systems and Their Relationship with the Response of Pepper Fruits to Storage at 20 °C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 6293-6299.
- Jovanovic A.M., Durst S. & Nick P.** (2010) Plant cell division is specifically affected by nitrotyrosine. *Journal of Experimental Botany* **61**, 901-909.
- Kan J., Wang H. & Jin C.** (2011) Changes of Reactive Oxygen Species and Related Enzymes in Mitochondrial Respiration During Storage of Harvested Peach Fruits. *Agricultural Sciences in China* **10**, 149-158.
- Kanazawa S., Sano S., Koshihara T. & Ushimaru T.** (2000) Changes in antioxidative enzymes in cucumber cotyledons during natural senescence: comparison with those during dark-induced senescence. *Physiologia Plantarum* **109**, 211-216.
- Kangasjarvi S., Lepisto A., Hannikainen K., Piippo M., Luomala E.M., Aro E.M. & Rintamaki E.** (2008) Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in plant stress responses. *Biochemical Journal* **412**, 275-285.
- Karpinski S., Escobar C., Karpinska B., Creissen G. & Mullineaux P.M.** (1997) Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in Arabidopsis during excess light stress. *Plant Cell* **9**, 627-640.
- Kato H., Takemoto D. & Kawakita K.** (2013) Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in potato plant. *Physiologia Plantarum* **148**, 371-386.
- Kim Y.S., Kim I.S., Bae M.J., Choe Y.H., Kim Y.H., Park H.M., Kang H.G. & Yoon H.S.** (2013) Homologous expression of cytosolic dehydroascorbate reductase increases grain yield and biomass under paddy field conditions in transgenic rice (*Oryza sativa* L. japonica). *Planta* **237**, 1613-1625.
- King M., Gildemeister O., Gaston B. & Mannick J.B.** (2005) Assessment of S-nitrosothiols on diaminofluorescein gels. *Analytical Biochemistry* **346**, 69-76.

- Kiuchi K., Nishikimi M. & Yagi K.** (1982) Purification and characterization of L-gulonolactone oxidase from chicken kidney microsomes. *Biochemistry* **21**, 5076-5082.
- Klie S., Osorio S., Tohge T., Drincovich M.F., Fait A., Giovannoni J.J., Fernie A.R. & Nikoloski Z.** (2014) Conserved changes in the dynamics of metabolic processes during fruit development and ripening across species. *Plant Physiology* **164**, 55-68.
- Kliebenstein D.J., Monde R.A. & Last R.L.** (1998) Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology* **118**, 637-650.
- König J., Muthuramalingam M. & Dietz K.** (2012) Mechanisms and dynamics in the thiol/disulfide redox regulatory network: transmitters, sensors and targets. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 261-268.
- Koussevitzky S., Suzuki N., Huntington S., Armijo L., Sha W., Cortes D., Shulaev V. & Mittler R.** (2008) Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 34197-34203.
- Kubienová L., Kopecný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Sebelá M., Navrátil M., Tâche R., Luhová L., Barroso J.B. & Petrivalský M.** (2013) Structural and functional characterization of a plant S-nitrosoglutathione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie* **95**, 889-902.
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Mieslerová B. & Petrivalský M.** (2014) Effect of abiotic stress stimuli on S-nitrosoglutathione reductase in plants. *Planta* **239**, 139-146.
- Kubienová L., Tichá T., Luhová L. & Petrivalský M.** (2016) Detection of S-Nitrosoglutathione Reductase Activity in Plants. *Methods in Molecular Biology* **1424**, 175-189.
- Kumar S., Yadav P., Jain V. & Malhotra S.P.** (2014) Isozymes of antioxidative enzymes during ripening and storage of ber (*Ziziphus mauritiana* Lamk.). *Journal of Food Science and Technology-Mysore* **51**, 329-34.
- Kunze C.M. & Trelease R.N.** (1986) Heterogeneity of catalase in maturing and germinated cotton seeds. *Plant Physiology* **81**, 1134-1139.
- Kwon E., Feechan A., Yun B.W., Hwang B.H., Pallas J.A., Kang J.G. & Loake G.J.** (2012) AtGSNOR1 function is required for multiple developmental programs in *Arabidopsis*. *Planta* **236**, 887-900.
- Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamattina L., García-Mata C., Graziano M. & Pagnussat G.** (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 109-136.

Bibliografía/ References

- Lee U., Wie C., Fernández B.O., Feelisch M. & Vierling E.** (2008) Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**, 786-802.
- Leferink N.G., van den Berg W.A. & van Berkel W.J.** (2008) l-Galactono-gamma-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *The FEBS journal* **275**, 713-726.
- León A.M., Palma J.M., Corpas F.J., Gómez M., Romero-Puertas M.C., Chatterjee D., Mateos R.M., del Río L.A. & Sandalio L.M.** (2002) Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 813-820.
- Leshem Y.Y., Wills R. & Veng-Va Ku V.** (1998) Evidence for the function of the free radical gas - nitric oxide (NO) - as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants *Plant Physiology and Biochemistry* **36**, 825-833.
- Leshem Y.Y. & Pinchasov Y.** (2000) Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). *Journal of Experimental Botany* **51**, 1471-1473.
- Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M. & del Río L.A.** (2005) Peroxisomal monodehydroascorbate reductase. Genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant Physiology* **138**, 2111-2123.
- Leterrier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J.M., Barroso J.B. & Corpas F.J.** (2011) Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling Behavior* **6**, 789-793.
- Leterrier M., Airaki M., Palma J.M., Chaki M., Barroso J.B. & Corpas F.J.** (2012) Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in *Arabidopsis*. *Environmental Pollution* **166**, 136-143.
- Li M., Ma F., Liu J. & Li J.** (2010) Shading the whole vines during young fruit development decreases ascorbate accumulation in kiwi. *Physiologia Plantarum* **140**, 225-237.
- Lindermayr C., Saalbach G. & Durner J.** (2005) Proteomic Identification of S-Nitrosylated Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**, 921-930.
- Lindermayr C., Saalbach G., Bahnweg G. & Durner J.** (2006) Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 4285-4291.
- Linster C., Gomez T., Christensen K., Adler L., Young B., Brenner C. & Clarke S.** (2007) *Arabidopsis* VTC2 Encodes a GDP-L-galactose phosphorylase, the last unknown enzyme in the Smirnoff-Wheeler pathway to ascorbic acid in plants. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 18879 - 18885.
- Linster C.L. & Clarke S.G.** (2008) L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2. *Trends in Plant Science* **13**, 567-573.

- Lisenbee C.S., Lingard M.J. & Trelease R.N.** (2005) Arabidopsis peroxisomes possess functionally redundant membrane and matrix isoforms of monodehydroascorbate reductase. *The Plant Journal* **43**, 900-914.
- Liu F., Wang L., Gu L., Zhao W., Su H. & Cheng X.** (2015) Higher transcription levels in ascorbic acid biosynthetic and recycling genes were associated with higher ascorbic acid accumulation in blueberry. *Food Chemistry* **188**, 399-405.
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J. & Stamler J.S.** (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490-494.
- Liu S., Dong Y.J., Xu L.L., Kong J. & Bai X.Y.** (2013) Roles of exogenous nitric oxide in regulating ionic equilibrium and moderating oxidative stress in cotton seedlings during salt stress. *Journal of soil science and plant nutrition* **13**, 929-941.
- Liu Y., Yao Y., Hu X., Xing S. & Xu L.** (2015) Cloning and allelic variation of two novel catalase genes (SoCAT-1 and SsCAT-1) in *Saccharum officinarum* L. and *Saccharum spontaneum* L. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **29**, 431-440.
- Liu Z., Rudd M.A., Freedman J.E. & Loscalzo J.** (1998) S-Transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **284**, 526-534.
- Livak K.J. & Schmittgen T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) method. *Methods* **25**, 402-408.
- Loewus F.A. & Kelly S.** (1961) Identity of L-ascorbic acid formed from D-glucose by the strawberry (*Fragaria*). *Nature* **191**, 1059-1061.
- Loewus F.A.** (1999) Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry* **52**, 193 - 210.
- López-Huertas E., Sandalio L.M. & del Río L.A.** (1995) Integral membrane polypeptides of pea leaf peroxisomes. Characterization and response to plant stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **33**, 295-302.
- López-Huertas E., Corpas F.J., Sandalio L.M. & del Río L.A.** (1999) Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *The Biochemical Journal* **337**, 531-536.
- López-Huertas E. & del Río L.A.** (2014) Characterization of antioxidant enzymes and peroxisomes of olive (*Olea europaea* L.) fruits. *Journal of Plant Physiology* **171**, 1463-1471.
- Lorence A., Chevone B.I., Mendes P. & Nessler C.L.** (2004) myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology* **134**, 1200-1205.
- Lozano-Juste J. & León J.** (2010) Enhanced abscisic acid-mediated responses in nialnia2noa1-2 triple mutant impaired in NIA/NR- and AtNOA1-dependent nitric oxide biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* **152**, 891-903.

Bibliografía/ References

- Lozano-Juste J., Colom-Moreno R. & León J.** (2011) In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3501-3517.
- Lurie S., Shapiro B., Ben-Yehoshua S.** (1986) Effects of water and degree of ripeness on rate of senescence of harvested bell pepper. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **111**, 880-885.
- Malecka A., Jarmuszkiewicz W.a. & Tomaszewska1 B.** (2001) Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Bioquímica Polonica* **48**, 687-698.
- Macho A., Lucena C., Sancho R., Daddario N., Minassi A., Muñoz E. & Appendino G.** (2003) Non-pungent capsaicinoids from sweet pepper synthesis and evaluation of the chemopreventive and anticancer potential. *European Journal of Nutrition* **42**, 2-9.
- MacMillan-Crow L.A., Crow J.P. & Thompson J.A.** (1998) Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* **37**, 1613-1622.
- Madamanchi N.R., Donahue J.L., Cramer C.L., Alscher R.G. & Pedersen K.** (1994) Differential response of Cu,Zn superoxide dismutases in two pea cultivars during a short-term exposure to sulfur dioxide. *Plant Molecular Biology* **26**, 95-103.
- Madhusudhan R., Ishikawa T., Sawa Y., Shigeoka S. & Shibata H.** (2003) Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells. *Physiologia Plantarum* **117**, 550-557.
- Manai J., Kalai T., Gouia H. & Corpas F.J.** (2014) Exogenous nitric oxide (NO) ameliorates salinity-induced oxidative stress in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Journal of soil science and plant nutrition* **14**, 433-446.
- Mapson L.W. & Isherwood F.A.** (1956) Biological synthesis of ascorbic acid: the conversion of derivatives of d-galacturonic acid into l-ascorbic acid by plant extracts. *Biochemical Journal* **64**, 13-22.
- Marín A., Ferreres F., Tomás-Barberán F.A. & Gil M.I.** (2004) Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annum L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 3861-3869.
- Marone M., Mozzetti S., De Ritis D., Pierelli L. & Scambia G.** (2001) Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biological Procedures Online* **3**, 19-25.
- Martí M.C., Camejo D., Olmos E., Sandalio L.M., Fernández-García N., Jiménez A. & Sevilla F.** (2009) Characterisation and changes in the antioxidant system of chloroplasts and chromoplasts isolated from green and mature pepper fruits. *Plant Biology* **11**, 613-624.
- Martí M.C., Camejo D., Vallejo F., Romojaro F., Bacarizo S., Palma J.M., Sevilla F. & Jiménez A.** (2011) Influence of fruit ripening stage and harvest period on the

- antioxidant content of sweet pepper cultivars. *Plant Foods for Human Nutrition* **66**, 416-423.
- Martínez S., López M., González-Raurich M. & Bernardo Alvarez A.** (2005) The effects of ripening stage and processing systems on vitamin C content in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **56**, 45-51.
- Massot C., Stevens R., Genard M., Longuenesse J.J. & Gautier H.** (2012) Light affects ascorbate content and ascorbate-related gene expression in tomato leaves more than in fruits. *Planta* **235**, 153-163.
- Massot C., Bancel D., Lauri F.L., Truffault V., Baldet P., Stevens R. & Gautier H.** (2013) High Temperature Inhibits Ascorbate Recycling and Light Stimulation of the Ascorbate Pool in Tomato despite Increased Expression of Biosynthesis Genes. *PLoS One* **8**, 1-13.
- Mata-Pérez C., Sánchez-Calvo B., Padilla M.N., Begara-Morales J.C., Valderrama R., Corpas F.J. & Barroso J.B.** (2017) Nitro-fatty acids in plant signaling: New key mediators of nitric oxide metabolism. *Redox Biology* **11**, 554-561.
- Mateos R.M., León A.M., Sandalio L.M., Gómez M., del Río L.A. & Palma J.M.** (2003) Peroxisomes from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.): purification, characterisation and antioxidant activity. *Journal of Plant Physiology* **160**, 1507-1516.
- Mateos R.M., Bonilla-Valverde D., del Río L.A., Palma J.M. & Corpas F.J.** (2009) NADP-dehydrogenases from pepper fruits: effect of maturation. *Physiologia Plantarum* **135**, 130-139.
- Mateos R., Jiménez A., Román P., Romojaro F., Bacarizo S., Leterrier M., Gómez M., Sevilla F., del Río L., Corpas F. & Palma J.M.** (2013) Antioxidant systems from pepper (*Capsicum annuum* L.): involvement in the response to temperature changes in ripe fruits. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 9556-9580.
- Materska M. & Perucka I.** (2005) Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1750-1756.
- Matsuda Y., Okuda T. & Sagisaka S.** (1994) Regulation of Protein Synthesis by Hydrogen Peroxide in Crowns of Winter Wheat. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **58**, 906-909.
- Meir S., Philosoph-Hadas S., Zauberman G., Fuchs Y., Akerman M. & Aharoni N.** (1991) Increased Formation of Fluorescent Lipid-peroxidation Products in Avocado Peels Precedes Other Signs of Ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **116**, 823-826.
- Melino V., Soole K. & Ford C.** (2009) Ascorbate metabolism and the developmental demand for tartaric and oxalic acids in ripening grape berries. *BMC Plant Biology* **9**, 1-14.
- Mellidou I., Keulemans J., Kanellis A.K. & Davey M.W.** (2012) Regulation of fruit ascorbic acid concentrations during ripening in high and low vitamin C tomato cultivars. *BMC Plant Biology* **12**, 1-19.

Bibliografía/ References

- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F. & Noctor G.** (2010) Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4197-4220.
- Mhamdi A., Noctor G. & Baker A.** (2012) Plant catalases: peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **525**, 181-194.
- Mieda T., Yabuta Y., Rapolu M., Motoki T., Takeda T., Yoshimura K., Ishikawa T. & Shigeoka S.** (2004) Feedback inhibition of spinach L-galactose dehydrogenase by L-ascorbate. *Plant & Cell Physiology* **45**, 1271-1279.
- Mignolet-Spruyt L., Xu E., Idanheimo N., Hoerberichts F.A., Muhlenbock P., Brosche M., Van Breusegem F. & Kangasjarvi J.** (2016) Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of Experimental Botany* **67**, 3831-3844.
- Millar A.H., Mittova V., Kiddle G., Heazlewood J.L., Bartoli C.G., Theodoulou F.L. & Foyer C.H.** (2003) Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology* **133**, 443-447.
- Mínguez-Mosquera M.I. & Hornero-Méndez D.** (1994) Formation and transformation of pigments during the fruit ripening of *Capsicum annuum* Cv. Bola and Agridulce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**, 38-44.
- Mitsuda H. & Yasumatsu K.** (1955) Studies on plant catalase. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan* **19**, 208-213.
- Mittler R. & Zilinskas B.A.** (1991) Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiology* **97**, 962-968.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. & Van Breusegem F.** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**, 490-498.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V. & Van Breusegem F.** (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* **16**, 300-309.
- Mittler R.** (2017) ROS Are Good. *Trends in Plant Science* **22**, 11-19.
- Miyake C., Schreiber U., Hormann H., Sano S. & Kozi A.** (1998) The FAD-enzyme monodehydroascorbate radical reductase mediates photoproduction of superoxide radicals in spinach thylakoid membranes. *Plant and Cell Physiology* **39**, 821-829.
- Moncada S., Palmer R. & Higgs E.** (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews* **43**, 109-142.
- Mondal K., Sharma N.S., Malhotra S.P., Dhawan K. & Singh R.** (2003) Oxidative stress and antioxidant systems in tomato fruits during storage. *Journal of Food Biochemistry* **27**, 515-527.
- Mondal K., Sharma N.S., Malhotra S.P., Dhawan K. & Singh R.** (2004) Antioxidant Systems in Ripening Tomato Fruits. *Biologia Plantarum* **48**, 49-53.

- Mondal K., Malhotra S.P., Jain V. & Singh R.** (2009) Oxidative stress and antioxidant systems in Guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. *Physiology and Molecular Biology in Plants* **15**, 327-334.
- Moore S., Payton P., Wright M., Tanksley S. & Giovannoni J.** (2005) Utilization of tomato microarrays for comparative gene expression analysis in the Solanaceae. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2885-2895.
- Moran J.F., James E.K., Rubio M.C., Sarath G., Klucas R.V. & Becana M.** (2003) Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules. *Plant Physiology* **133**, 773-782.
- Morgado C.M.A., Durigan J.F., Sanches J., Galati V.C. & Ogassavara F.O.** (2008) Conservação pós-colheita de frutos de pimentão sob diferentes condições de armazenamento e filmes. *Horticultura Brasileira* **26**, 170-174.
- Navarro J.M., Flores P., Garrido C. & Martinez V.** (2006) Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry* **96**, 66-73.
- Ni W., Trelease R.N. & Eising R.** (1990) Two temporally synthesized charge subunits interact to form the five isoforms of cottonseed (*Gossypium hirsutum*) catalase. *Biochemical Journal* **269**, 233-8.
- Ni W. & Trelease R.N.** (1991a) Post-Transcriptional Regulation of Catalase Isozyme Expression in Cotton Seeds. *The Plant Cell* **3**, 737-744.
- Ni W. & Trelease R.N.** (1991b) Two genes encode the two subunits of cottonseed catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **289**, 237-243.
- Nie Q., Gao G.L., Fan Q.J., Qiao G., Wen X.P., Liu T., Peng Z.J. & Cai Y.Q.** (2015) Isolation and characterization of a catalase gene "HuCAT3" from pitaya (*Hylocereus undatus*) and its expression under abiotic stress. *Gene* **563**, 63-71.
- Nishikimi M., Tolbert B.M. & Udenfriend S.** (1976) Purification and characterization of L-gulonono-gamma-lactone oxidase from rat and goat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **175**, 427-435.
- Noctor G. & Foyer C.** (1998) Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and plant molecular biology* **49**, 249 - 279.
- Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G. & Foyer C.H.** (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ* **35**, 454-84.
- Ôba K., Fukui M., Imai Y., Iriyama S. & Nogami K.** (1994) L-galactono- γ -lactone dehydrogenase: partial characterization, induction of activity and role in the synthesis of ascorbic acid in wounded white potato tuber tissue. *Plant & Cell Physiology* **35**, 473-478.
- O'Brien J.A., Daudi A., Butt V.S. & Bolwell G.P.** (2012) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* **236**, 765-779.

Bibliografía/ References

- Ogawa K., Sumio K., Takabe K., Asada K.** (1995) Attachment of CuZn-Superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplasts: detection by immuno-gold labeling after rapid freezing and substitution method. *Plant & Cell Physiology* **36**, 565-573.
- Ortega-Galisteo A.P., Rodríguez-Serrano M., Pazmino D.M., Gupta D.K., Sandalio L.M. & Romero-Puertas M.C.** (2012) S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2089-2103.
- Ostergaard Jens P.G., Daevy Mark W., Bauw Guy and Montagu Van** (1997) Insolation of cDNA Coding for Galactono-1,4-Lactone Dehydrogenase, an Enzyme involved in the Biosynthesis of Ascorbic Acid in Plants: purification, characterization, cDNA cloning, and expression in yeast. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 30009-30016.
- Pallanca J. & Smirnoff N.** (1999) Ascorbic acid metabolism in pea seedlings. A comparison of D-glucosone, L-sorbosone, and L-galactono-1,4-lactone as ascorbate precursors. *Plant Physiology* **120**, 453 - 462.
- Palma J.M., Pastori G.M., Bueno P., Distefano S. & del Río L.A.** (1997) Purification and properties of cytosolic copper, zinc superoxide dismutase from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) cotyledons. *Free Radical Research* **26**, 83-91.
- Palma J.M., López-Huertas E., Corpas F.J., Sandalio L.M., Gómez M. & del Río L.A.** (1998) Peroxisomal manganese superoxide dismutase: Purification and properties of the isozyme from pea leaves. *Physiologia Plantarum* **104**, 720-726.
- Palma J.M., Jiménez A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Lundqvist M., Gómez M., Sevilla F. & del Río L.A.** (2006) Antioxidative enzymes from chloroplasts, mitochondria, and peroxisomes during leaf senescence of nodulated pea plants. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1747-1758.
- Palma J.M., Jiménez A., Corpas F.J., Mateos R.M., Martí M.C., Sevilla F. & del Río L.A.** (2011a) Role of ascorbate on the fruit physiology of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Functional Plant Science and Biotechnology* **5**, 56-61.
- Palma J.M., Corpas F.J. & del Río L.A.** (2011b) Proteomics as an approach to the understanding of the molecular physiology of fruit development and ripening. *Journal of Proteomics* **74**, 1230-1243.
- Palma J.M., Gupta D.K. & Corpas F.J.** (2013) Metalloenzymes Involved in the Metabolism of Reactive Oxygen Species and Heavy Metal Stress. In: *Heavy Metal Stress in Plants* (eds. by Gupta DK, Corpas FJ & Palma JM), pp. 1-17. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Palma J.M., Sevilla F., Jiménez A., del Río L.A., Corpas F.J., Álvarez de Morales P. & Camejo D.M.** (2015) Physiology of pepper fruit and the metabolism of antioxidants: chloroplasts, mitochondria and peroxisomes. *Annals of Botany* **116**, 627-636.

- Palma J.M., Corpas F.J., Ruíz C., Molina T., Campos Ramos M.J., Juanena A. & Torreira J.R.** (2016) Los pimientos de las variedades Padrón, Piquillo y Alegría riojana: una buena fuente de macro y microelementos para nuestra dieta. *Horticultura* **323**, 60-64
- Parra-Lobato M.C. & Gómez-Jiménez M.C.** (2011) Polyamine - induced modulation of genes involved in ethylene biosynthesis and signalling pathways and nitric oxide production during olive mature fruit abscission. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4447-4465.
- Passardi F., Penel C. & Dunand C.** (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* **9**, 534-540.
- Pateraki I., Sanmartin M., Kalamaki M.S., Gerasopoulos D. & Kanellis A.K.** (2004) Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of l-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1623-1633.
- Peng D., Wang X., Li Z., Zhang Y., Peng Y., Li Y., He X., Zhang X., Ma X., Huang L. & Yan Y.** (2016) NO is involved in spermidine-induced drought tolerance in white clover via activation of antioxidant enzymes and genes. *Protoplasma* **253**, 1243-1254.
- Perotti V.E., Moreno A.S. & Podestá F.E.** (2014) Physiological aspects of fruit ripening: The mitochondrial connection. *Mitochondrion* **17**, 1-6.
- Pilon M., Ravet K. & Tapken W.** (2011) The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1807**, 989-998.
- Polverari A., Molesini B., Pezzotti M., Buonauro R., Marte M. & Delledonne M.** (2003) Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **16**, 1094-1105.
- Pressman E., Moshkovitch H., Rosenfeld K., Shaked R., Gamliel B. & Aloni B.** (1998) Influence of low night temperatures on sweet pepper flower quality and the effect of repeated pollinations, with viable pollen, on fruit setting. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **73**, 131-136.
- Pressman E., Shaked R. & Firon N.** (2006) Exposing pepper plants to high day temperatures prevents the adverse low night temperature symptoms. *Physiologia Plantarum* **126**, 618-626.
- Pristijono P., Wills R.B.H. & Golding J.B.** (2008) Use of the nitric oxide-donor compound, diethylenetriamine-nitric oxide (DETANO), as an inhibitor of browning in apple slices. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **83**, 555-558.
- Purdue P.E. & Lazarow P.B.** (2001) Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 701-752.
- Quessada M. & Macheix J.** (1984) Caractérisation d'une peroxidase impliqué spécifiquement dans la lignification, en relation avec l'incompatibilité au greffage chez l'abricotier. *Physiologie Végétale* **22**, 533-540.

Bibliografía/ References

- Radi R.** (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academic of Science U S A* **101**, 4003-4008.
- Radi R.** (2013a) Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 26464-26472.
- Radi R.** (2013b) Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Account of Chemical Research* **46**, 550-559.
- Raffo A., Baiamonte I., Nardo N. & Paoletti F.** (2007) Internal quality and antioxidants content of cold-stored red sweet peppers as affected by polyethylene bag packaging and hot water treatment. *European Food Research and Technology* **225**, 395-405.
- Raffo A., Baiamonte I. & Paoletti F.** (2008) Changes in antioxidants and taste-related compounds content during cold storage of fresh-cut red sweet peppers. *European Food Research and Technology* **226**, 1167-1174.
- Reyes-Escogido M.L., Gonzalez-Mondragon E.G. & Vazquez-Tzompantzi E.** (2011) Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules* **16**, 1253-1270.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J. & Kaiser W.M.** (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany* **53**, 103-110.
- Rodríguez-Ruiz M., Mateos R.M., Codesido V., Corpas F.J. & Palma J.M.** (2017) Characterization of the galactono-1,4-lactone dehydrogenase from pepper fruits and its modulation in the ascorbate biosynthesis. Role of nitric oxide. *Redox Biology* **12**, 171-181.
- Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M.C., Pastori G.M., Corpas F.J., Sandalio L.M., del Río L.A. & Palma J.M.** (2007) Peroxisomal membrane manganese superoxide dismutase: characterization of the isozyme from watermelon (*Citrullus lanatus* Schrad.) cotyledons. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2417-2427.
- Roessner U., Wagner C., Kopka J., Trethewey R.N. & Willmitzer L.** (2000) Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *The Plant Journal* **23**, 131-142.
- Romero-Puertas M., Palma J., Gómez M., del Río L.A & Sandalio L.** (2002) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell & Environment* **25**, 677-686.
- Romero-Puertas M.C., Corpas F.J., Sandalio L.M., Leterrier M., Rodríguez-Serrano M., del Río L.A. & Palma J.M.** (2006) Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *The New Phytologist* **170**, 43-52.
- Romero-Puertas M.C., Laxa M., Matte A., Zaninotto F., Finkemeier I., Jones A.M., Perazzoli M., Vandelle E., Dietz K.J. & Delledonne M.** (2007) S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *The Plant Cell* **19**, 4120-4130.

- Romero-Puertas M.C., Campostrini N., Mattè A., Righetti P.G., Perazzolli M., Zolla L., Roepstorff P. & Delledonne M.** (2008) Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics* **8**, 1459-1469.
- Rubbo H.** (2013) Nitro-fatty acids: novel anti-inflammatory lipid mediators. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **46**, 728-734.
- Rustérucci C., Espunya M.C., Díaz M., Chabannes M. & Martínez M.C.** (2007) S-nitrosogluthathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiology* **143**, 1282-1292.
- Sabularse V.C., Montalbo M.N., Hernández H.P. & Serrano E.P.** (2009) Preparation of nata de coco-based carboxymethylcellulose coating and its effect on the post-harvest life of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) fruits. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **60**, 206-218.
- Sagi M. & Fluhr R.** (2006) Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology* **141**, 336-340.
- Sakamoto A., Ueda M. & Morikawa H.** (2002) *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosogluthathione reductase. *FEBS Letters* **515**, 20-24.
- Salin M.L.** (1988) Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia Plantarum* **72**, 681-689.
- Saltveit M.E.** (1977) Carbon dioxide, ethylene and color development in ripening mature green bell pepper. *Journal of American Society of Horticultural Science* **102**, 523-527.
- Sandalio L.M., Lòpez-Huertas E., Bueno P. & del Río L.A.** (1997) Immunocytochemical localization of copper,zinc superoxide dismutase in peroxisomes from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad) cotyledons. *Free Radical Research* **26**, 187-194.
- Sandalio L.M., Dalurzo H.C., Gómez M., Romero-Puertas M.C. & del Río L.A.** (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2115-2126.
- Santa-Cruz D.M., Pacienza N.A., Zilli C.G., Tomaro M.L., Balestrasse K.B. & Yannarelli G.G.** (2014) Nitric oxide induces specific isoforms of antioxidant enzymes in soybean leaves subjected to enhanced ultraviolet-B radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **141**, 202-209.
- Sanz L., Albertos P., Mateos I., Sanchez-Vicente I., Lechon T., Fernandez-Marcos M. & Lorenzo O.** (2015) Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. *Journal of Experimental Botany* **66**, 2857-2868.
- Saraiva J.A., Cláudia C.S., Nunes S. & Coimbra M.A.** (2010) Chapter 36 - Purification and Characterization of Olive (*Olea europaea* L.) Peroxidases A2 - Preedy, Victor R. In: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (ed. by Watson RR), pp. 325-32. Academic Press, San Diego.

Bibliografía/ References

- Scandalios J.G.** (1990) Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Advances in Genetics* **28**, 1-41.
- Scandalios J.G., Guan L. & Polidoros A.N.** (1997) Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. *Cold Spring Harbor Monograph Series* **34**, 343-406.
- Schertl P., Sunderhaus S., Klodmann J., Grozeff G.E.G., Bartoli C.G. & Braun H.-P.** (2012) 1-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GLDH) Forms Part of Three Subcomplexes of Mitochondrial Complex I in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 14412-14419.
- Schimmeyer J., Bock R. & Meyer E.H.** (2016) L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase is an assembly factor of the membrane arm of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **90**, 117-126.
- Schnarrenberger C., Oeser A. & Tolbert N.E.** (1971) Development of microbodies in sunflower cotyledons and castor bean endosperm during germination. *Plant Physiology* **48**, 566-574.
- Sevilla F., del Río L.A. & Hellín E.** (1984) Superoxide Dismutases from a Citrus Plant: Presence of Two Iron-containing Isoenzymes in Leaves of Lemon Trees (*Citrus limonum* L.). *Journal Plant Physiology* **116**, 381-387.
- Shaked R., Rosenfeld K. & Pressman E.** (2004) The effect of low night temperatures on carbohydrates metabolism in developing pollen grains of pepper in relation to their number and functioning. *Scientia Horticulturae* **102**, 29-36.
- Shapiro A.D.** (2005) Nitric oxide signaling in plants. In: *Plant Hormones* (ed. by Litwack G), pp. 339-98.
- Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S. & Pessarakl I.M.** (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* **2012**, 1-26.
- Sharma S.K., Vij A.S. & Sharma M.** (2013) Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *European Journal of Pharmacology* **720**, 55-62.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y. & Yoshimura K.** (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1305-1319.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y. & Yoshimura K.** (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1305-1319.
- Shin S.Y., Kim M.H., Kim Y.H., Park H.M. & Yoon H.S.** (2013) Co-expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase from *Brassica rapa* effectively confers tolerance to freezing-induced oxidative stress. *Molecules and Cells* **36**, 304-315.
- Shugaev A.G., Lashtabega D.A., Shugaeva N.A. & Vyskrebentseva E.I.** (2011) Activities of antioxidant enzymes in mitochondria of growing and dormant sugar beet roots. *Russian Journal of Plant Physiology* **58**, 387-393.

- Siendones E., González-Reyes J., Santos Ocaña C., Navas P. & Córdoba F.** (1999) Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean: L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at mitochondrial inner membrane. *Plant Physiology*. **120**, 907-912.
- Signorelli S., Corpas F.J., Borsani O., Barroso J.B. & Monza J.** (2013) Water stress induces a differential and spatially distributed nitro-oxidative stress response in roots and leaves of *Lotus japonicus*. *Plant Science* **201-202**, 137-146.
- Singh S., Singh Z. & Swinny E.** (2009) Postharvest nitric oxide fumigation delays fruit ripening and alleviates chilling injury during cold storage of Japanese plums (*Prunus salicina* Lindell). *Postharvest Biology and Technology* **53**, 101-108.
- Singh Z., Khan A.S., Zhu S. & Payne A.D.** (2013) Nitric oxide in the regulation of fruit ripening: challenges and thrusts. *Stewart Postharvest Review* **9**, 1-11.
- Skadsen R.W., Schulze-Lefert P. & Herbst J.M.** (1995) Molecular cloning, characterization and expression analysis of two catalase isozyme genes in barley. *Plant Molecular Biology* **29**, 1005-1014.
- Slesak I., Libik M., Karpinska B., Karpinski S. & Miszalski Z.** (2007) The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica Polonica* **54**, 39-50.
- Smirnoff N. & Wheeler G.L.** (2000) Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 291-314.
- Smirnoff N.** (2000) Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **355**, 1455-1464.
- Smirnoff N., Running J.A. & Gatzek S.** (2004) Ascorbate biosynthesis: a diversity of pathways. *Vitamin C: Its Functions and Biochemistry in Animals and Plants*, 7-29.
- Smirnoff N.** (2011) Vitamin C: The Metabolism and Functions of Ascorbic Acid in Plants. In: *Advances in Botanical Research* (eds. by Fabrice R & Roland D), pp. 107-77.
- Smith D.L., Stommel J.R., Fung R.W.M., Wang C.Y. & Whitaker B.D.** (2006) Influence of cultivar and harvest method on postharvest storage quality of pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology* **42**, 243-7.
- Smith J.N. & Dasgupta T.P.** (2000) Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by l-ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide. *Nitric Oxide* **4**, 57-66.
- Smith M.W. & Doolittle R.F.** (1992) A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *Journal of Molecular Evolution* **34**, 175-184.
- Sofa A., Scopa A., Nuzzaci M. & Vitti A.** (2015) Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 13561-13578.

Bibliografia/ References

- Sommer-Knudsen J., Bacic A. & Clarke A.E.** (1998) Hydroxyproline-rich plant glycoproteins. *Phytochemistry* **47**, 483-497.
- Souza J.M., Peluffo G. & Radi R.** (2008) Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker? *Free Radical Biology & Medicine* **45**, 357-366.
- Squadrito G.L. & Pryor W.A.** (1998) Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxyxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radical Biology & Medicine* **25**, 392-403.
- Srinivasan K.** (2014) Antioxidant potential of spices and their active constituents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **54**, 352-372.
- Srivalli B. & Khanna-Chopra R.** (2001) Induction of New Isoforms of Superoxide Dismutase and Catalase Enzymes in the Flag Leaf of Wheat during Monocarpic Senescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **288**, 1037-1042.
- Stamler J.S., Lamas S. & Fang F.C.** (2001) Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* **106**, 675-683.
- Stöhr C., Strube F., Marx G., Ullrich W.R. & Rockel P.** (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* **212**, 835-841.
- Su Y., Guo J., Ling H., Chen S., Wang S., Xu L., Allan A.C. & Que Y.** (2014) Isolation of a Novel Peroxisomal Catalase Gene from Sugarcane, Which Is Responsive to Biotic and Abiotic Stresses. *PLoS One* **9**, 1-11.
- Sun Y. & Oberley L.W.** (1989) The inhibition of catalase by glutathione. *Free Radical Biology and Medicine* **7**, 595-602.
- Sung Y., Chang Y.-Y. & Ni-Lun T.** (2005) Capsaicin biosynthesis in water-stressed hot pepper fruits. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **46**, 35-42.
- Surmeli N.B., Litterman N.K., Miller A.F. & Groves J.T.** (2010) Peroxynitrite mediates active site tyrosine nitration in manganese superoxide dismutase. Evidence of a role for the carbonate radical anion. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 17174-17185.
- Switala J. & Loewen P.C.** (2002) Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **401**, 145-154.
- Symons G.M., Chua Y.J., Ross J.J., Quittenden L.J., Davies N.W. & Reid J.B.** (2012) Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *Journal of Experimental Botany* **63**, 4741-4750.
- Szabo C., Ischiropoulos H. & Radi R.** (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery* **6**, 662-680.
- Szarka A., Banhegyi G. & Asard H.** (2013) The inter-relationship of ascorbate transport, metabolism and mitochondrial, plastidic respiration. *Antioxidants & Redox Signaling* **19**, 1036-1044.

- Tamaoki M., Mukai F., Asai N., Nakajima N., Kubo A., Aono M. & Saji H.** (2003) Light-controlled expression of a gene encoding L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase which affects ascorbate pool size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **164**, 1111 - 1117.
- Tang Z.X. & Yang H.L.** (2013) Functional divergence and catalytic properties of dehydroascorbate reductase family proteins from *Populus tomentosa*. *Molecular Biology Report* **40**, 5105-5114.
- Tanou G., Molassiotis A. & Diamantidis G.** (2009) Hydrogen peroxide- and nitric oxide-induced systemic antioxidant prime-like activity under NaCl-stress and stress-free conditions in citrus plants. *Journal of Plant Physiology* **166**, 1904-1913.
- Tanou G., Filippou P., Belghazi M., Job D., Diamantidis G., Fotopoulos V. & Molassiotis A.** (2012) Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. *The Plant Journal* **72**, 585-599.
- Tedone L., Hancock R., Alberino S., Haupt S. & Viola R.** (2004) Long-distance transport of L-ascorbic acid in potato. *BMC Plant Biology* **4**, 1-8.
- Tian S., Qin G. & Li B.** (2013) Reactive oxygen species involved in regulating fruit senescence and fungal pathogenicity. *Plant Molecular Biology* **82**, 593-602.
- Tichá T., Cincalová L., Kopecný D., Sedlářová M., Kopecná M., Luhová L. & Petrivalský M.** (2016) Characterization of S-nitrosoglutathione reductase from *Brassica* and *Lactuca* spp. and its modulation during plant development. *Nitric Oxide*, 1-9.
- Truffault V., Gautier H. & Stevens R.G.** (2013) Influence of ascorbate-recycling, light and temperature during tomato fruit ripening on ascorbate pool and ascorbate-degradation. In: In: 11th International conference on reactive oxygen and nitrogen species in plants. *Journal of Biotechnology computational and bionanotechnology* **94**, 156-202.
- Truffault V., Gest N., Garchery C., Florian A., Fernie A.R., Gautier H. & Stevens R.G.** (2016) Reduction of MDHAR activity in cherry tomato suppresses growth and yield and MDHAR activity is correlated with sugar levels under high light. *Plant Cell Environ* **39**, 1279-1292.
- Truffault V., Fry S.C., Stevens R.G. & Gautier H.** (2017) Ascorbate degradation in tomato leads to accumulation of oxalate, threonate and oxalyl threonate. *The plant journal* **89**, 996-1008.
- Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E.I. & Scherer G.F.** (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant & Cell Physiology* **47**, 346-354.
- Vaahtera L., Brosche M., Wrzaczek M. & Kangasjarvi J.** (2014) Specificity in ROS signaling and transcript signatures. *Antioxidants & Redox Signaling* **21**, 1422-1441.

Bibliografía/ References

- Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Luque F., Gómez-Rodríguez M.V., Colmenero-Varea P., del Río L.A. & Barroso J.B.** (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters* **581**, 453-461.
- Valpuesta V. & Botella M.A.** (2004) Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends in Plant Science* **9**, 573-577.
- Van Camp W., Inzé D. & Van Montagu M.** (1997) The regulation and function of tobacco superoxide dismutases. *Free Radical Biology & Medicine* **23**, 515-520.
- Vanderauwera S., Hoebrechts F.A., Van Breusegem F.** (2009) Hydrogen peroxide-responsive genes in stress acclimation and cell death. In: del Río L.A., Puppo A., ed. *Reactive Oxygen Species in plant signalling*. Berlin, Heidelberg:Springer- Verlag. 149-164
- Wagner G. & Loewus F.** (1973) The biosynthesis of (+)-tartaric acid in *Pelargonium crispum*. *Plant Physiology* **52**, 651 -654.
- Wei L.T., Wang L.N., Yang Y., Wang P.F., Guol T.C. & Kang G.Z.** (2015) Abscisic acid enhances tolerance of wheat seedlings to drought and regulates transcript levels of genes encoding ascorbate-glutathione biosynthesis. *Frontiers in Plant Science* **6**, 1-11.
- Wheeler G., Jones M. & Smirnoff N.** (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**, 365 - 369.
- Wheeler G., Ishikawa T., Pornsaksit V. & Smirnoff N.** (2015) Evolution of alternative biosynthetic pathways for vitamin C following plastid acquisition in photosynthetic eukaryotes. *Elife* **4**, 1-25.
- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Van Montagu M., Inzé D. & Van Camp W.** (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *The EMBO Journal* **16**, 4806-4816.
- Wills R.B.H., Ku V.V.V. & Leshem Y.Y.** (2000) Fumigation with nitric oxide to extend the postharvest life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology* **18**, 75-79.
- Wills R.B.H., Soegiarto L. & Bowyer M.C.** (2007) Use of a solid mixture containing diethylenetriamine/nitric oxide (DETANO) to liberate nitric oxide gas in the presence of horticultural produce to extend postharvest life. *Nitric Oxide* **17**, 44-49.
- Wimalasekera R., Tebartz F. & Scherer G.F.** (2011a) Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Science* **181**, 593-603.
- Wimalasekera R., Villar C., Begum T. & Scherer G.F.** (2011b) Copper amine oxidase1 (CuAO1) of *Arabidopsis thaliana* contributes to abscisic acid- and polyamine-induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction. *Molecular Plant* **4**, 663-678.
- Wolucka B.A. & Van Montagu M.** (2003) GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 47483-47490.

- Wolucka B.A. & Van Montagu M.** (2007) The VTC2 cycle and the de novo biosynthesis pathways for vitamin C in plants: an opinion. *Phytochemistry* **68**, 2602-2613.
- Wootton-Beard P.C. & Ryan L.** (2011) Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International* **44**, 3135-3148.
- Wu B., Guo Q., Li Q., Ha Y., Li X. & Chen W.** (2014) Impact of postharvest nitric oxide treatment on antioxidant enzymes and related genes in banana fruit in response to chilling tolerance. *Postharvest Biology and Technology* **92**, 157-163.
- Xu M.** (2007) Nitric oxide: a potential key point of the signaling network leading to plant secondary metabolite biosynthesis. *Progress in Natural Science* **17**, 1397-1404.
- Xu S., Guerra D., Lee U. & Vierling E.** (2013) S-nitrosoglutathione reductases are low-copy number, cysteine-rich proteins in plants that control multiple developmental and defense responses in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* **4**, 1-13.
- Xu Y., Zhu X.W., Chen Y.L., Gong Y.Q. & Liu L.W.** (2013) Expression profiling of genes involved in ascorbate biosynthesis and recycling during fleshy root development in radish. *Plant Physiology and Biochemistry* **70**, 269-277.
- Yabuta Y., Yoshimura K., Takeda T. & Shigeoka S.** (2000) Molecular characterization of tobacco mitochondrial L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase and its expression in Escherichia coli. *Plant & Cell Physiology* **41**, 666-675.
- Yabuta Y., Motoki T., Yoshimura K., Takeda T., Ishikawa T. & Shigeoka S.** (2002) Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **32**, 915-925.
- Yamamoto Y., Kobayashi Y. & Matsumoto H.** (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiology* **125**, 199-208.
- Yamasaki H., Sakihama Y. & Ikehara N.** (1997) Flavonoid-Peroxidase Reaction as a Detoxification Mechanism of Plant Cells against H₂O₂. *Plant Physiology* **115**, 1405-1412.
- Yamasaki H., Sakihama Y. & Takahashi S.** (1999) An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Science* **4**, 128-129.
- Yan X., Zhang X., Lu M., He Y. & An H.** (2015) De novo sequencing analysis of the Rosa roxburghii fruit transcriptome reveals putative ascorbate biosynthetic genes and EST-SSR markers. *Gene* **561**, 54-62.
- Yang X.Y., Xie J.X., Wang F.F., Zhong J., Liu Y.Z., Li G.H. & Peng S.A.** (2011) Comparison of ascorbate metabolism in fruits of two citrus species with obvious difference in ascorbate content in pulp. *Journal of Plant Physiology* **168**, 2196-2205.
- Yoshimura K., Nakane T., Kume S., Shiomi Y., Maruta T., Ishikawa T. & Shigeoka S.** (2014) Transient expression analysis revealed the importance of VTC2 expression level

Bibliografia/ References

- in light/dark regulation of ascorbate biosynthesis in Arabidopsis. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **78**, 60-66.
- Yun B.W., Skelly M.J., Yin M., Yu M., Mun B.G., Lee S.U., Hussain A., Spoel S.H. & Loake G.J.** (2016) Nitric oxide and S-nitrosoglutathione function additively during plant immunity. *New phytologist* **211**, 516-526.
- Zaffagnini M., De Mia M., Morisse S., Di Giacinto N., Marchand C.H., Maes A., Lemaire S.D. & Trost P.** (2016) Protein S-nitrosylation in photosynthetic organisms: a comprehensive overview with future perspectives. *Biochimica Biophysica Acta* **1864**, 952-966.
- Zafra A., Jiménez-Quesada M., Traverso J., Corpas F., Rodríguez-García M. & Alché J.** (2012) Peroxisomal localization of CuZn superoxide dismutase in the male reproductive tissues of the olive tree. *Microscopy and Microanalysis* **18**, 33-34.
- Zaharah S.S. & Singh Z.** (2011) Postharvest nitric oxide fumigation alleviates chilling injury, delays fruit ripening and maintains quality in cold-stored 'Kensington Pride' mango. *Postharvest Biology and Technology* **60**, 202-210.
- Zhu L.-Q., Zhou J., Shu-Hua Z. & Lai-Hui G.** (2009) Inhibition of browning on the surface of peach slices by short-term exposure to nitric oxide and ascorbic acid. *Food Chemistry* **114**, 174-179.
- Zhu L.-Q., Zhou J. & Zhu S.-H.** (2010) Effect of a combination of nitric oxide treatment and intermittent warming on prevention of chilling injury of 'Feicheng' peach fruit during storage. *Food Chemistry* **121**, 165-170.
- Zhu S. & Zhou J.** (2006) Effects of nitric oxide on fatty acid composition in peach fruits during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 9447-9452.
- Zhu S. & Zhou J.** (2007) Effect of nitric oxide on ethylene production in strawberry fruit during storage. *Food Chemistry* **100**, 1517-1522.

Table 1. Pepper (<i>Capsicum annuum</i> L.) yield (kg/ha) by country in 2014.....	Pag.16
Table 2. Reactivity (mode of action), production systems and scavenging of ROS in plant cells.....	Pag.27
Table 3. Major ROS scavenging antioxidant enzymes.....	Pag.29
Table 4. Main sources of NO in plants.....	Pag.43
Table 5. Main reactive nitrogen species (RNS) including inorganic and organic molecules.....	Pag.47
Table 6. Hydroponic nutrient solution.....	Pag.61
Table 7. <i>In vitro</i> treatments of antioxidant enzymes from pepper fruits with different potential modulators.....	Pag.72
Table 8. Primers used for semiquantitative PCR.....	Pag.89
Table 9. Primers used for real time PCR for <i>GalLDH</i> expression in different organs of pepper plants.....	Pag.90
Table 60. Modulation of ROS and RNS metabolism during pepper fruits ripening.....	Pag.202
Table 11. Effect of NO, ONOO ⁻ and reductants on some pepper enzymatic activities under <i>in vitro</i> assays.....	Pag.202
Table 12. Effect of enriched-NO atmosphere on pepper fruit metabolism.....	Pag.203
Tabla 2.1. Main characteristics of the SOD types described in plants.....	Pag.128
Table 3.1. Immunisation and bleed protocol for the production of an antibody against pepper GalLDH.....	Pag.154
Table 3.2. Analysis <i>in silico</i> of the GalLDH sequence with GPS-YNO2 1.0 and GPS-SNO 1.0 programs to deduce aminoacids (Tyr and Cys) which might be potentially modified by either nitration or S-nitrosylation.....	Pag.157
Table 4.1. Beneficial effects of exogenous NO gas application to different fruits.....	Pag.183
Table 4.2. Putative pepper proteins identified as susceptible to be S-nitrosylated.....	Pag.191

Figure 1. Percentage of pepper fruits production by countries in 2014.....	Pag.15
Figure 2. Morphology of pepper plants.....	Pag.17
Figure 3. <i>Capsicum</i> varieties.....	Pag.18
Figure 4. Phenotypes of the different types of pepper.....	Pag.19
Figure 5. Events which take place during ripening of pepper fruits.....	Pag.22
Figure 6. Formation of different ROS from oxygen reduction.....	Pag.25
Figure 7. Role of ROS.....	Pag.28
Figure 8. Effects of ROS on the regulation of different cellular processes.....	Pag.28
Figure 9. Ascorbate-glutathione cycle (AsA-GSH).....	Pag.32
Figure 10. Ascorbic acid biosynthesis pathways in plants.....	Pag.35
Figure 11. The extended VTC2 cycle proposed by Wolucka and Van Montagu (2007)....	Pag.36
Figure 12. Catabolic pathways of ascorbic acid.....	Pag.39
Figure 13. Main functions of NO in plants under physiological and adverse environmental conditions.....	Pag.45
Figure 14. Model of post-traslational modifications mediated by nitric oxide in plant cells.....	Pag.50
Figure 15. Types of pepper fruits used in this work.....	Pag.59
Figure 16. Processing of pepper fruits for further assays.....	Pag.60
Figure 17. Growing conditions and storage of pepper plant's organs.....	Pag.60
Figure 18. Pepper plants exposed to high light intensity.....	Pag.61
Figure 19. Incubation of pepper fruits with nitric oxide gas.....	Pag.63
Figure 20. Basis of detection of protein <i>S</i> -nitrosothiols (SNO) in polyacrylamide gels using DAF-FM.....	Pag.76
Figure 21. Side view of Model 422 electro-eluter assembly.....	Pag.79
Figure 22. Chemiluminescence detection in PVDF membranes after protein transfer.....	Pag.81
Figure 1.1. Activity of peroxidases.....	Pag.100
Figure 1.2. (a) Contents of total chlorophylls (green colour) and carotenoids (red colour) in pepper fruits at three different ripening stages. (b) Absorption spectra of pepper fruits...	Pag.101
Figure 1.3. Lipid peroxidation of pepper fruits at two ripening stages (Green and Red)...	Pag.102
Figure 1.4. Catalase activity in pepper fruits at two ripening stages (Green and Red).....	Pag.103

Índice de figuras

Figure 1.5. Isoenzymatic activity and protein expression of catalase in pepper fruits.....	Pag.104
Figure 1.6. Modulation of catalase activity from pepper fruits by H ₂ O ₂	Pag.105
Figure 1.7. Catalase activity in native gels of pepper samples subjected to different H ₂ O ₂ concentrations.....	Pag.105
Figure 1.8. Experimental design for analysis of catalase activity in pepper fruits.....	Pag.106
Figure 1.9. Assay of catalase activity in pepper fruits as a function of time.....	Pag.107
Figure 1.10. Assay of catalase isoenzymatic activity and protein expression as a function of time in pepper fruit.....	Pag.107
Figure 1.11. Effect of different modulating agents on catalase activity from pepper fruits.....	Pag.108
Figure 1.12. Effect of reduced glutathione (GSH) and nitrosoglutathione (GSNO) on the catalase activity from green pepper fruits.....	Pag.109
Figure 1.13. Non-denaturing electrophoresis of pepper catalase at different acrylamide concentration.....	Pag.111
Figure 1.14. Estimation of the native molecular weight of catalase from pepper fruits by the Hedrick and Smith method.....	Pag.111
Figure 1.15. Gel filtration and electrophoretic analysis of concentrated crude extracts from pepper fruits.....	Pag.112
Figure 1.16. Determination of the native molecular mass of catalase from pepper fruits by gel filtration chromatography.....	Pag.113
Figure 1.17. Determination of pI of catalase from pepper fruit by IEF.....	Pag.114
Figure 1.18. Guaiacol peroxidase in pepper fruits at two different ripening stages.....	Pag.114
Figure 1.19. Peroxidase isozymes in pepper fruits after non-denaturing PAGE.....	Pag.115
Figure 1.20. Effect of exogenous NO gas on the ripening of pepper fruits.....	Pag.116
Figure 1.21 Peroxidase isozymes in pepper fruits treated with NO.....	Pag.117
Figure 2.1. Dismutation of superoxide radical (O ₂ ⁻) by superoxide dismutase activity...	Pag.125
Figure 2.2. Superoxide dismutase (SOD) isozymes from green and red pepper fruits and immunoblot assay probed with an antibody against a Fe-SOD.....	Pag.129
Figure 2.3. Superoxide dismutase (SOD) isozymes in the different organs of pepper plants and immunoblot analysis probed with an antibody against a Fe-SOD.....	Pag.130
Figure 2.4. Isoenzymatic SOD activity and protein expression of Fe-SOD in different autochthonous Spanish pepper fruits.....	Pag.131

Figure 2.5. Isoenzymatic SOD activity and protein expression of Fe-SOD in different plant species.....	Pag.133
Figure 2.6. Analysis of SOD activity and Western blotting in peroxisomes from green and red pepper fruits.....	Pag.134
Figure 2.7. Superoxide dismutase (SOD) activity of pepper fruit after treatment with exogenous NO gas and further incubation for 1-2 weeks at different temperature conditions.....	Pag.135
Figure 2.8. Analysis on gel electrophoresis of the activity of the different SOD isozymes of green pepper fruit samples pre-incubated with different chemicals.....	Pag.136
Figure 2.9. Analysis on gel electrophoresis of the activity of the different SOD isozymes of red pepper fruit samples pre-incubated with different chemicals.....	Pag.137
Figure 2.10. Phenotype of 30 days old pepper plants after 4 h of mechanical wounding applied to pepper leaves by using forceps.....	Pag.138
Figure 2.11. Superoxide dismutase (SOD) activity in native-PAGE and protein expression of Fe-SOD from pepper leaves after 4 h of mechanical wounding (W) applied to leaves.....	Pag.139
Figure 2.12. Histochemical detection of lipid peroxidation in leaves of pepper plants exposed to high light intensity.....	Pag.139
Figure 2.13. Superoxide dismutase (SOD) activity and protein expression of Fe-SOD in leaves of pepper plants exposed to high light intensity.....	Pag.140
Figure 3.1. Electron fluxes in the mitochondria inner membrane in pepper fruits.....	Pag.149
Figure 3.2. L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase activity and ascorbate content in pepper fruits at two ripening stages.....	Pag.152
Figure 3.3. Phylogenetic tree of the different higher plant L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) proteins.....	Pag.153
Figure 3.4. Immunological characterization of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase from pepper fruits.....	Pag.154
Figure 3.5. Effect of the treatment with exogenous NO gas on the ascorbate content and the GalLDH.....	Pag.155
Figure 3.6. <i>In vitro</i> assays of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase activity from pepper fruits under nitration and nitrosylation conditions.....	Pag.156
Figure 3.7. <i>In vitro</i> assays of galactono-1,4-lactone dehydrogenase activity from pepper fruits with reducing and oxidant agents.....	Pag.158
Figure 3.8. Ascorbate peroxidase (APX) activity in sweet pepper fruits.....	Pag.159
Figure 3.9. Activity of the ascorbate-glutathione cycle enzymes in pepper fruits during ripening.....	Pag.160
Figure 3.10. Effect of exogenous NO gas treatment on APX activity of sweet pepper fruits.....	Pag.161

Índice de figuras

Figure 3.11. Effect of exogenous NO gas treatment on the activity of ascorbate-glutation cycle enzymes.....	Pag.161
Figure. 3.12. <i>In vitro</i> assays of ascorbate peroxidase activity from pepper fruits under nitration and nitrosylation conditions.....	Pag.162
Figure 3.13. Galactose content during pepper fruit ripening and in fruits treated with NO gas.....	Pag.164
Figure 3.14. Myo-inositol content during pepper fruit ripening and in fruits treated with NO gas.....	Pag.165
Figure 3.15. Dehydroascorbate (DHA) content during pepper fruit ripening and in fruits treated with NO gas.....	Pag.166
Figure 3.16. Threonine content during pepper fruit ripening and in fruits treated with NO gas.....	Pag.167
Figure 3.17. Metabolism of sugars during ripening of fruits and in samples treated with NO gas.....	Pag.168
Figure 3.18. Relative GABA content during pepper fruit ripening and GABA concentration (mg/g FW) in fruits treated with NO gas.....	Pag.169
Figure 3.19. Glutamic acid content during pepper fruit ripening and in fruits treated with NO gas.....	Pag.170
Figure 3.20. Relative methionine content in fruits subjected to treatment with NO gas...Pag.	171
Figure 3.21. Cysteine content in fruits subjected to treatment with NO gas.....Pag.	171
Figure 3.22. Galactono – 1, 4 –lactone dehydrogenase activity and gene expression in different organs of pepper plants.....Pag.	173
Figure 4.1. Processes of <i>S</i> -nitrosylation/denitrosylation.....Pag.	185
Figure 4.2. <i>S</i> -nitrosogluthatione reductase (GSNOR) activity during the ripening of pepper fruit.....Pag.	186
Figure 4.3. <i>S</i> -nitrosogluthatione reductase (GSNOR) activity in native PAGE, protein content and gene expression during the ripening of pepper fruits.....Pag.	187
Figure 4.4. <i>S</i> -nitrogluthatione reductase (GSNOR) activity of pepper fruit exposed to enriched NO atmosphere.....Pag.	188
Figure 4.5. Activity and protein expression of <i>S</i> -nitrosogluthation reductase (GSNOR) after pepper fruits were exposed to enriched-NO atmosphere.....Pag.	189
Figure 4.6. Endogenous detection of <i>S</i> -nitrosylated (<i>S</i> -nitrosated) proteins in pepper fruits on DAF gels.....Pag.	190
Figure 4.7. Silver staining of electroeluded proteins on SDS-PAGE gel.....Pag.	191

Figure 4.8. *In vitro* effect of different chemicals on the cytochrome *c* oxidase activity from pepper.....Pag.192

Figure 4.9. Proposed model for the involvement of reactive nitrogen species (RNS) on the ripening of pepper fruits.....Pag.196

ABREVIATURAS

AO: Ascorbato oxidasa

ACO: 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa

APX: Ascorbato peroxidasa

AsA: Ascorbato

AsA-GSH: Ciclo ascorbato-glutatión

BSA: Albúmina de suero bovino

CAPS: Ácido-3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico

CAT: Catalasa

CCO: Citocromo *c* oxidasa

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

cPTIO: 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido

CuZn-SOD: Cuprocinc superóxido dismutasa

Cys: Cisteína

DA: Deshidroascorbato

DAB: 3,3-diaminobencidina

DAF-FM: 3-amino,4-amitiometil-2,7-difluoresceína

DAR: Deshidroascorbato reductasa

DEPC: Dietilpirocarbonato

DHA: Deshidroascorbato

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato

DTT: 1,4-Ditiotreitol

EDTA: Ácido etilén-diamino-tetraacético

EE: Electrolución

EGPA: Electroforesis en geles de poliacrilamida

FA: Ácido graso

FAD: Flavín adeninina dinucleótido

Fe-SOD: Ferro superóxido dismutasa

FMN: Flavín mononucleótido

FPLC: Cromatografía líquida

GABA: Ácido γ aminobutirico

GalLDH: L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa

GC/MS: Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas

GGP: GDP-L-galactosa fosforilasa

GMP: GDP-D-manosa-pirofosforilasa

GF: Pimiento verde/ Green fruit

Glu: Glutamato

Gly: Glicina

GME: GDP-D-manosa-3,5-epimerasa,

GPX: Guayacol peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido (γ -glutamyl-L-cisteín-glicina)

GSNO: S-nitrosoglutación

GSNOR: S-nitrosoglutation reductasa

GSSG: Glutación oxidado

HEPES: Ácido N-[2-hidroxietyl]piperacina-N'-[2-etanosulfónico]

HNO₃: Ácido nítrico

HRGPs: Hidroxilación de residuos de prolina en glicoproteínas

IDH: L-idonato deshidrogenasa

IEF: Isoelectroenfoque

IgG: Inmunoglobulina G

L-Gal: L-Galactosa

MDA: malondialdehído

MDA: Monodeshidroascorbato

MDAR: Monodeshidroascorbato reductasa

ME: 2-Mercaptoetanol

Met: Metionina

MG: matrices peroxisomales de pimiento verde

MIOX: mio-inositol oxigenasa

Mn-SOD: Manganeso superóxido dismutasa

MSTFA: N-Metil-N-(trimetilsili) trifluoroacetamida

NADH: Nicotinamín adenina dinucleótido reducido

NADP: Nicotinamín adenina dinucleótido fosfato oxidado

NADPH: Nicotinamín adenina dinucleótido fosfato reducido

NEM: *N*-etilmaleimida

Ni-NOR: Nitrito-NO-reductasa

N₂O₃: Trióxido de dinitrógeno

NO: Óxido nítrico

NO₂: Dióxido de nitrógeno

NO₂⁻: Nitrito

NO₃⁻: Nitrato

NO₂FA: Ácidos grasos nitrados

NOS: Óxido nítrico sintasa

NOX: NADPH oxidasa

NR: Nitrato reductasa

ONOO⁻: Peroxinitrito

ONOOH: Ácido peroxinitroso

PBS: Tampón fosfato salino

PCD: Muerte celular programada

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PER: Peroxidasa

PI: Patrón interno

PMI: Fosfomanosa impomerasa

PMP: Polipéptido de la membrana peroxisomal

PODs: Peroxidasas

PRX: Peroxirredosina

PS I/II: Fotosistema I/II

PTMs: Modificaciones post-traduccionales

PTS: Secuencia señal programada

PVDF: Difluoruro de polivinilo

PVPP: Polivinil polipirrolidona

RF: Pimiento rojo / Red fruit

RNA: Ácido ribonucleico

RNS: Especies de nitrógeno reactivo

ROS: Especies de oxígeno reactivo

RT: Temperatura ambiente

SDS: Dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

SIN-1: 3- morpholinosydnonimine

SNOs: S-nitrosotiol

SNP: Nitroprusiato sódico

SOD: Superóxido dismutasa

TBARS: Ácido tiobarbitúrico

TBS: Tampón tris salino

TBST: Tampón Tris salino con Tween-20

TCA: Ácido tricloroacético

TEMED: N, N, N', N'-Tetrametiletildiamina

Trx: Tiorredoxina

TR: Tiorredoxina reductasa

TRIS: Tris-hidroximetilaminometano

Trp: Triptófano

Tyr: Tirosina

UV: Ultravioleta

VDE: violaxantina depoxigenasa

VTC: Vitamin C



La maduración y post-cosecha de frutos de pimiento son procesos que tienen asociados cambios drásticos en el metabolismo, así como en sus características fenotípicas. Dentro de los cambios metabólicos que se producen hay que destacar los asociados a los sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, que están implicados en la modulación de los niveles de las especies de oxígeno reactivo (ROS). Esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de la dinámica de los sistemas antioxidantes que operan durante la maduración y la post-cosecha en el fruto de pimiento.

Debido a que el pimiento es una de las hortalizas con mayor contenido en ascorbato, se han investigado algunos mecanismos implicados en su síntesis y degradación, aportando datos preliminares sobre los niveles de metabolitos implicados en dichos eventos. Asimismo, se investigó la interacción de las enzimas del metabolismo del ascorbato con las especies de nitrógeno reactivo (RNS) y su potencial regulación por estas especies durante la maduración de los frutos.

El óxido nítrico (NO) es un radical implicado en numerosos procesos fisiológicos. Durante esta Memoria Doctoral se ha estudiado el efecto de la aplicación de atmósferas enriquecidas en NO sobre los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en frutos de pimiento.

En conjunto, los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral nos han permitido profundizar en cómo los sistemas antioxidantes y el NO participan en la maduración de frutos de pimiento en un forma que parece indicar la existencia de una inter-comunicación muy activa entre ellos durante dicho proceso fisiológico.

Pepper fruit ripening and post-harvest are processes that have associated drastic changes in the metabolism, as well as in its phenotypic characteristics. Among the metabolic changes which take place, it is important to highlight the antioxidant systems, both enzymatic and non-enzymatic, that are involved in the modulation of reactive oxygen species (ROS) levels. This PhD Thesis has been focused on the study of the antioxidant systems that operate during pepper fruit ripening and post-harvest.

Considering that pepper fruit is one of the vegetables with the highest ascorbate (Asa) content, during this work some of the mechanisms involved in its synthesis and degradation have been addressed. We have studied at biochemical and molecular level enzymes involved in the AsA biosynthetic pathway, and data on the levels of metabolites involved in the synthesis and degradation of AsA are also provided. Likewise, the interaction of the enzymes of the ascorbate metabolism with reactive nitrogen species (RNS) was investigated as well as their potential regulation during ripening of fruits by these species.

Nitric oxide (NO) is a free radical molecule involved in numerous physiological processes. During this PhD thesis, the effect of NO-enriched atmospheres on enzymatic and non-enzymatic antioxidants in pepper fruits has been also studied.

In summary, the obtained data in this PhD Thesis have allowed us getting deeper knowledge on the pepper fruits ripening where both antioxidant systems and NO metabolism have very active interactions.

