



# GENÉTICA MOLECULAR DE LA CUTÍCULA DEL FRUTO DE TOMATE

---

Laura Rueda Herrera



Programa de doctorado  
de Biotecnología Avanzada  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Málaga  
2017

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA




Directores: **Eva Domínguez Carmona**  
**José Juan Reina Pinto**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Laura Rueda Herrera

 <http://orcid.org/0000-0002-6798-8602>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización

pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Portada: Fotografía superior, vista aérea de la finca experimental La Mayora (<https://www.facebook.com/164647663569950/photos/a.1109333172434723.1073741846.164647663569950/1389684367732934/?type=3&theater>). Fotografía de frutos de tomate *S. lycopersicum* 'MoneyMaker' tomada por Laura Rueda Herrera. Diseño realizado por Chon-Hou Ng.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



**CSIC**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOTECNOLOGÍA AVANZADA**

# **Genética molecular de la cutícula del fruto de tomate**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Biología

**Laura Rueda Herrera**

para optar al grado de

**Doctora en Biología por la Universidad de Málaga**

**Directores:**

**Dra. Eva Domínguez Carmona**

**Dr. José Juan Reina Pinto**

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora

(IHSM-UMA-CSIC)

Málaga, abril de 2017





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

EVA DOMÍNGUEZ CARMONA, Científica Contratada del IHSM, y JOSÉ JUAN REINA PINTO, Doctor en Ciencias por la Universidad de Málaga, directores del trabajo realizado por la Licenciada en Biología **Laura Rueda Herrera**

CERTIFICAN: que la Memoria titulada «**Genética molecular de la cutícula del fruto de tomate**» que presenta la Licenciada **Laura Rueda Herrera** para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Málaga a día 28 de abril de 2017.

Fdo: Eva Domínguez Carmona

Fdo: José Juan Reina Pinto



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



ANTONIO HEREDIA BAYONA, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga,

**RATIFICA QUE:** la tesis Doctoral titulada: «**Genética molecular de la cutícula del fruto de tomate**» ha sido realizada por Doña LAURA RUEDA HERRERA, Licenciada en Biología, para optar al Título de Doctora en Biología, bajo la dirección de los Doctores Eva Domínguez Carmona, Científica Contratada del IHSM-UMA-CSIC y José Juan Reina Pinto, Doctor en Ciencias por la Universidad de Málaga.

Dicha tesis se presenta por el programa de doctorado de Biotecnología Avanzada de la Universidad de Málaga.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Málaga a día 28 de abril de 2017.

Fdo.: Antonio Heredia Bayona  
Tutor de la Tesis



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## Facultad de Ciencias

### Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

MIGUEL ÁNGEL MEDINA TORRES, Director del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

INFORMA QUE: la tesis Doctoral titulada: «**Genética molecular de la cutícula del fruto de tomate**» que presenta Doña LAURA RUEDA HERRERA para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo la dirección de los Doctores Doña Eva Domínguez Carmona, Científica Contratada del IHSM, y Don José Juan Reina Pinto, Doctor en Ciencias por la Universidad de Málaga.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente en Málaga a 28 de abril de 2017.

Fdo: Miguel Ángel Medina Torres



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

El presente trabajo ha sido financiado por una Beca de Formación del Personal Investigador (FPI) asociada al proyecto AGL2009-12134 del Plan Nacional I+D, Ministerio de Educación y Ciencia (España).

Parte de los resultados recogidos en esta Memoria de Tesis Doctoral han sido incluidos en las siguientes publicaciones y congresos:

**Rueda-Herrera L, Bovy A, Heredia A, Domínguez E** (2013) Modification of the flavonoid biosynthetic pathway affects tomato fruit cuticle composition and mechanical properties. International Symposium on Plant Apoplastic Diffusion Barriers: Biosynthesis and Functions (PADIBA). Lausanne, Suiza.

**Rueda-Herrera L, Romero-Aranda R, Bovy A, Heredia A, Domínguez E** (2013) Implication of flavonoids in traits related with plant water status affect epidermal cell fate. Genomic, physiological and breeding approaches for enhancing drought tolerance in crops. Baeza, España.

**Rueda-Herrera L, Bovy A, Reina-Pinto JJ, Heredia A, Domínguez E** (2014) Implicación de los flavonoides en la calidad del fruto de tomate. XII Reunión de Biología Molecular de Plantas. Cartagena, España.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# AGRADECIMIENTOS

*«La diligencia en escuchar  
es el más breve camino hacia la ciencia»  
Julio Verne*





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



*En el momento en el que te toca cerrar un ciclo es cuando echas la vista atrás y te haces realmente consciente de todo el camino recorrido durante ese tiempo, de lo que has aprendido, de los buenos momentos y de las veces que te has caído, pero, sobre todo, te acuerdas de todas las personas que han estado contigo y que han recorrido ese mismo camino, de una manera u otra, junto a ti. Entonces sólo sale una palabra, ¡gracias! Gracias, porque sin vosotros no hubiese llegado hasta aquí.*

*En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores los Dres. Eva Domínguez Carmona y José J. Reina Pinto el haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo. Gracias no sólo por la formación que me habéis dado sino, especialmente, por enseñarme a afrontar las situaciones de manera práctica, por vuestros ánimos y por estar siempre disponibles a cualquier hora y día que lo he necesitado. Gracias por esos momentos en los que iba a buscaros por una duda rápida y terminábamos hablando de lo divino y lo humano. Agradecer al Dr. Antonio Heredia el ser más que un tutor. Gracias por haber contado conmigo para este proyecto, por todos los consejos durante este tiempo y por estar siempre pendiente de esta «canija».*

*Gracias al Dr. Jesús Cuartero por la atención y consejos al principio de esta aventura. Agradecer a Dr. Rafael Fernández Muñoz el estar siempre disponible a pesar de tener mil cosas entre manos, gracias por todos los conocimientos que aportas en cualquier conversación sea del tema que sea y por tener siempre alguna idea para mejorar este trabajo.*

*A la Dra. Gloria López Casado, por estar siempre dispuesta a ayudar en lo que hiciese falta y por todos los ánimos que nos has dado a las becarias. Gracias por tantos momentos de risas tanto en el laboratorio como en las comidas. Al resto del departamento de Mejora Genética y Biotecnología, las Dras. Marisa Gómez-Guillamón, Anabel López-Sesé y Marian Viruel, gracias por vuestra amabilidad durante estos años. De manera más especial, a Ana, Luis, Toñi y Manolo, gracias por enseñarme a desenvolverme en el laboratorio, sin vosotros todo hubiese sido mucho más difícil.*

*A Severiano, Gonzalo, Miguel Ángel y Álvaro agradecerle la ayuda en el cuidado de las plantas, parte esencial para sacar este trabajo adelante. Gracias por alegrar la estancia en el invernadero.*

*Gracias al resto del personal de La Mayora por todos estos años. Antonio, Marina Gil, Oliva, Rafa Gómez, Rafa «el rubio», los niños del campo, Rocío Camero, Jorge, Eduardo, Jero, Domingo, Pablo, Pedro, Carmelina, Encarnita, Estrella, Eli, Yoli, Sonia, María Victoria, Reme. A Cañi y Mariola, gracias por todas las comidas y charlas. A Amelia, José Antonio, Antoñita, Ana, Juan y Antonio Cordón muchas gracias por ayudarnos con todo el «papeleo» que siempre nos trae de cabeza y a Olaya, por solucionar siempre al momento los problemas informáticos. Al resto de compañeros de la Mayora, es imposible nombraros a todos, gracias por formar esta familia.*

*Agradecer al personal, tanto de Microscopía como de Análisis de imagen, del SCAI de la Universidad de Málaga la ayuda recibida. A Goyo (gracias por empezar el día con una sonrisa), David, Manoli y Salva, siempre dispuestos a ayudar y a mejorar para hacernos la vida más fácil.*

*A mis niñas del cuartito. A Laura España, por darme el relevo en este trabajo, por todos los consejos y ánimos. Espero que nuestros caminos se vuelvan a cruzar y poder compartir muchos más momentos. A Ro y María José, daros las gracias por vuestro apoyo y consejos como buenas veteranas. A Celes y Rida, por convertirnos en una parte muy importante de mi vida. Siempre tendremos una canción que bailar para levantar el ánimo o celebrar un éxito. A Rosa que, sin tener un sitio físico en el cuartito, formaba parte de él. A Inma, por todos estos años que hemos compartido desde la facultad. Empezamos juntas y terminamos la siguiente etapa igual. Esperemos que la próxima también la compartamos. ¡Por muchas más risas que bucles vividos juntas! Y muchísimas gracias a Marina, más conocida como mi Zape. El destino ha insistido en unirnos y, como siempre te digo, ya nunca te vas a librar de mí. Gracias por las risas y las lágrimas, por los abrazos, y, en definitiva, por ser como eres, especial y única. Gracias a todas por darle la vuelta a la silla y hacer corrillo en cuanto alguna de nosotras lo ha necesitado.*

*A mis compañeros doctorandos y doctores de la Mayora, A Pao, Isa, Librada, Willi, Jota, Anabel, Anelise, Yazmín, Jorge, Vero, Eli y Paco, y en especial a María, Nerea, Lourdes, Davinia y Caro, por todos los momentos de risas y agobios.*

*Gracias a mis compañeros de la facultad, Ale, Susana y Patri, por acogerme como una más y hacerme sentir como en casa. A Rafa Cameselle, por la ayuda técnica. A Francis (hoy no estaría escribiendo estas líneas sin no fuese por tu confianza en mí), Javier Márquez, Juani y José Manuel y el resto de compañeros del «Membrane Lab», Lauri (por todos los cafés juntas), Marta, Ana, Carolina Cardona, Carolina Lobo, Merche y Juan («Wan») por descubrirme el mundo de la investigación y disfrutar de ella.*

*Agradecerle a los que un día comenzaron siendo compañeros de Máster y a día de hoy considero mi «minifamilia». A Vero, Julio, Eli, Luis, Diego, Jose, Eli y Ana. Por sonreírle a la vida aunque ésta nos ponga las cosas difíciles.*

*A todos mis amigos, en especial a Bea, Isa, M. Carmen, Chono y Charo por todo el apoyo, por preguntarme cómo lo llevaba o por dejar de preguntar en un momento determinado y hablar, aunque fuese del tiempo. Por los abrazos, las risas, la paciencia conmigo y las palabras de ánimo. Por cambiar en más de una ocasión los planes para que me pudiese acoplar a ellos. Gracias no sólo por este tiempo sino por toda una vida de amistad.*

*A Alfredo, gracias por la paciencia, la comprensión, el apoyo incondicional, por el esfuerzo que haces para poder entender algo de lo que te cuento sobre el trabajo, por sacarme una sonrisa cuando me ves triste, por aportar tranquilidad y equilibrar mi nerviosismo, por ayudarme a llegar al final y por mucho más. Gracias por compartir conmigo la locura de la investigación, ya mismo consigues tu objetivo.*

*A mi familia, gracias por estar siempre al pie del cañón, por apoyarme en todo momento, por no dejarme tirar la toalla, pero sobre todo por cómo me queréis. Todo lo que soy os lo debo a vosotros (un tópico típico, pero al fin y al cabo realidad). A mi pequeña Ana por consentirme no dedicarle todo el tiempo que me gustaría (en breve le ponemos solución). Creo que nunca voy a poder devolveros todo lo que me dais.*

*A todos, ¡gracias!*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# ÍNDICES

*«El que busca la verdad corre el  
riesgo de encontrarla»  
Isabel Allende*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## ÍNDICE GENERAL

<b>Introducción general .....</b>	<b>1</b>
• El cultivo de tomate .....	3
- <i>Taxonomía y origen de la especie</i> .....	3
- <i>Importancia económica</i> .....	5
- <i>Agrietado</i> .....	8
• La cutícula vegetal .....	11
- <i>Composición, estructura y funciones</i> .....	11
- <i>Síntesis de cutícula</i> .....	17
- <i>Principales propiedades biofísicas</i> .....	20
◦ <u>Propiedades térmicas</u> .....	20
◦ <u>Propiedades hídricas</u> .....	21
◦ <u>Propiedades biomecánicas</u> .....	22
• Flavonoides .....	24
- <i>Clasificación y estructura</i> .....	24
- <i>Localización y funciones</i> .....	25
- <i>Genes involucrados en su síntesis y regulación</i> .....	29
<b>Objetivos .....</b>	<b>37</b>
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>41</b>
• Instalaciones .....	43
• Material vegetal .....	43
• Diseño experimental .....	44
• Semilleros y cultivos .....	44
• Recolección de muestras .....	47
• Medida de la superficie foliar .....	48
• Determinación de la biomasa vegetal .....	48
• Cosecha y peso medio del fruto .....	49
• Cantidad y viabilidad del polen .....	49
• Cantidad de semillas por fruto .....	50
• Crecimiento y maduración del fruto .....	50
• Evaluación del agrietado y microrrayado del fruto .....	51

• Dureza del fruto .....	51
• Transpiración del fruto durante la poscosecha .....	51
• Determinación del contenido de sólidos solubles, acidez valorable y aceptabilidad del sabor del fruto .....	52
• Color del fruto y de la cutícula .....	53
• Aislamiento de la cutícula .....	54
• Determinación de la cantidad de cutícula .....	54
• Análisis cuantitativo de los componentes de la cutícula .....	55
• Análisis cualitativo de ceras y cutina .....	55
• Estudio de las propiedades mecánicas de la cutícula .....	56
• Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) ...	57
• Fijadores y colorantes para microscopía .....	57
- <i>FAA</i> .....	57
- <i>Gelatinización de portaobjetos</i> .....	57
- <i>Acetocarmín</i> .....	58
- <i>Sudán IV</i> .....	58
- <i>Azul de toluidina O</i> .....	58
- <i>Calcoflúor</i> .....	58
- <i>Auramina O</i> .....	59
• Cortes histológicos .....	59
• Determinación del grosor y grado de invaginación de la cutícula y del tamaño y forma de las células epidérmicas .....	60
• Microscopía electrónica de barrido .....	61
• Densidad de células epidérmicas .....	61
• Bioinformática .....	62
• Extracción y purificación de ADN .....	62
• Extracción y purificación de ARN y síntesis de ADNc .....	63
• PCR cuantitativa a tiempo real .....	64
- <i>Determinación del número de copias del transgén</i> .....	64
- <i>Niveles de expresión</i> .....	65
• Análisis estadísticos .....	68



<b>Capítulo 1. Metabolismo de los flavonoides: análisis de la expresión de genes implicados .....</b>	<b>69</b>
• Introducción .....	71
• Resultados .....	76
• Discusión .....	101
<b>Capítulo 2. Interacción entre las rutas de síntesis de flavonoides y de cutícula .....</b>	<b>109</b>
• Introducción .....	111
• Resultados .....	119
• Discusión .....	150
<b>Capítulo 3. Influencia del nitrógeno en la síntesis de flavonoides y de cutícula .....</b>	<b>165</b>
• Introducción .....	167
• Resultados .....	171
• Discusión .....	191
<b>Conclusiones .....</b>	<b>199</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>203</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>249</b>
• Anexo I .....	251
• Anexo II .....	255
• Anexo III .....	257
• Anexo IV .....	261
• Anexo V .....	271
• Anexo VI .....	283

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Introducción general

I-1. Agrietado y microrrayado en el fruto de tomate .....	9
I-2. Imágenes de microscopía de lacutícula vegetal .....	12
I-3. Esquema de un corte transversal de la cutícula vegetal .....	13
I-4. Estructura química de los principales componentes de la cutina .....	14
I-5. Diagrama de fluencia y diagrama esfuerzo-deformación de la cutícula de fruto de tomate .....	23
I-6. Clasificación de los flavonoides según su esqueleto de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC .....	25
I-7. Principales flavonoides presentes en el fruto de tomate	26
I-8. Fotografía de fragmentos de cutículas aisladas procedentes de frutos de tomate maduros de distintos genotipos .....	27
I-9. Esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de flavonoides .....	31

### Materiales y métodos

M-1. Interior del invernadero de tipo multitúnel utilizado en este trabajo .....	43
M-2. Estadios de desarrollo del fruto estudiados en este trabajo .	47
M-3. Estadios del desarrollo de hoja y raíz estudiados en este trabajo .....	48
M-4. Escala empleada para evaluar la severidad del agrietado	51

### Capítulo 1

1-1. Esquema del inicio de la ruta de biosíntesis de los flavonoides .....	71
1-2. Alineamiento de proteínas de los distintos miembros de la familia CHS de tomate .....	77
1-3. Árboles filogenéticos consenso de la familia CHS de tomate .....	79
1-4. Árbol filogenético de CHS de varias especies de plantas ....	81
1-5. Alineamiento de proteínas de los distintos miembros de la familia CHI de tomate .....	82
1-6. Árbol filogenético consenso de la familia CHI de tomate	83
1-7. Árbol filogenético de CHI de varias especies de plantas ....	84

1-8. Alineamiento de proteínas de los distintos miembros de la familia F3H-FLS de tomate .....	86
1-9. Árbol filogenético consenso de la familia F3H-FLS de tomate .....	87
1-10. Árbol filogenético de F3H y FLS de varias especies de plantas .....	88
1-11. Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios y tejidos de fruto de tomate para cada uno de los genes <i>CHS</i>	90
1-12. Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios y tejidos de fruto de tomate para cada uno de los genes <i>CHI</i> .....	92
1-13. Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios y tejidos de fruto de tomate para cada uno de los genes <i>F3H</i> y <i>FLS</i> .....	93
1-14. Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de hoja de tomate para cada uno de los genes <i>CHS</i>	94
1-15. Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de hoja de tomate para cada uno de los genes <i>CHI</i>	95
1-16. Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de hoja de tomate para cada uno de los genes <i>F3H</i> y <i>FLS</i> .....	96
1-17. Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de raíz de tomate para cada uno de los genes <i>CHS</i>	97
1-18. Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de raíz de tomate para cada uno de los genes <i>CHI</i>	98
1-19. Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de raíz de tomate para cada uno de los genes <i>F3H</i> y <i>FLS</i> .....	99
1-20. Árbol filogenético de F3H y FLS de varias especies de plantas .....	107

## Capítulo 2

2-1. Cantidad de semillas por fruto de plantas MM control y plantas <i>CHIOx</i> y <i>CHI/FNSox</i> .....	120
2-2. Cantidad y viabilidad de polen .....	121
2-3. Cantidad de frutos maduros por planta, peso medio de los mismos y cosecha (peso frutos maduros/planta) .....	122

<b>2-4.</b> Transpiración, expresada como flujo de agua, de frutos rojo maduro durante la poscosecha .....	122
<b>2-5.</b> Frutos rojo maduro y cutículas aisladas de MM, <i>CH1ox</i> y <i>CH1/FNSox</i> homocigotos .....	123
<b>2-6.</b> Parámetros de color del espacio CIE L*C*H° medidos en fruto, mesocarpo y cutícula de tomates rojo maduro procedentes de plantas MM control y plantas homocigotas <i>CH1ox</i> y <i>CH1/FNSox</i> .....	124
<b>2-7.</b> Dureza de los frutos rojo maduro .....	124
<b>2-8.</b> Porcentaje de agrietado total e índice de agrietado de frutos rojo maduro .....	125
<b>2-9.</b> Porcentaje de microrrayado presente en frutos rojo maduro..	126
<b>2-10.</b> Acidez valorable, contenido en sólidos solubles y aceptabilidad del sabor (unidades arbitrarias) de frutos rojo maduro .....	126
<b>2-11.</b> Densidad de células epidérmicas a lo largo del desarrollo del fruto .....	127
<b>2-12.</b> Microfotografías de cortes histológicos de pericarpo de frutos de tomate en dos estadios del desarrollo .....	128
<b>2-13.</b> Tamaño de las células epidérmicas del fruto medido en dos estadios del desarrollo .....	129
<b>2-14.</b> Composición cualitativa de las ceras de la cutícula de frutos rojo maduro .....	136
<b>2-15.</b> Composición cualitativa de los distintos tipos de ceras de la cutícula de frutos rojo maduro .....	136
<b>2-16.</b> Composición cualitativa de la cutina de frutos rojo maduro	137
<b>2-17.</b> Índice de esterificación de la cutina aislada .....	138
<b>2-18.</b> Cantidad relativa de ARNm de los genes del metabolismo de los fenoles <i>CHS1</i> , <i>CHS2</i> , <i>PAL4</i> , <i>PAL5</i> , <i>PAL6</i> medidos en epicarpo .....	141
<b>2-19.</b> Cantidad relativa de ARNm de genes estructurales relacionados con la cutícula determinados en epicarpo .....	145
<b>2-20.</b> Cantidad relativa de ARNm de factores de transcripción relacionados con la cutícula y flavonoides determinados en el epicarpo .....	146
<b>2-21.</b> Altura de las plantas y superficie foliar .....	147
<b>2-22.</b> Densidad estomática del haz y envés de hojas en dos estadios del desarrollo .....	149

2-23. Densidad de tricomas presentes en el haz y envés de hojas en dos estadios del desarrollo .....	149
2-24. Densidad de células del pavimento del haz y envés de hojas en dos estadios del desarrollo .....	151
2-25. Pesos fresco y seco y contenido de agua de hoja y tallo .....	152

### Capítulo 3

3-1. Cutículas aisladas de frutos de la entrada RIL115 de tomate cultivados con distintas concentraciones de nitrógeno .....	170
3-2. Cantidad relativa (CR) de ARNm de los genes del metabolismo de los fenoles <i>CHS1</i> , <i>CHS2</i> , <i>PAL4</i> , <i>PAL5</i> , <i>PAL6</i> y <i>MYB12</i> medidos en epicarpo .....	172
3-3. Densidad de células del epicarpo a lo largo del desarrollo ..	174
3-4. Tamaño de las células epidérmicas de frutos procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno ....	175
3-5. Microfotografías de cortes histológicos de pericarpo de frutos de tomate procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno .....	176
3-6. Índice de esterificación de la cutina aislada de frutos rojo maduro .....	179
3-7. Cantidad de frutos maduros por planta, peso medio de los mismos y cosecha (peso frutos maduros/planta) de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno .....	180
3-8. Porcentaje de agrietado total e índice de agrietado de frutos rojo maduro .....	181
3-9. Porcentaje de microrrayado presente en frutos rojo maduro .	182
3-10. Dureza de los frutos rojo maduro .....	182
3-11. Transpiración, expresada como flujo de agua, de frutos rojo maduro durante la poscosecha .....	183
3-12. Parámetros de color del espacio CIE L*C*H° medidos en fruto, mesocarpo y cutícula de tomates rojo maduro .....	184
3-13. Acidez valorable, contenido en sólidos solubles y aceptabilidad del sabor (unidades arbitrarias) de frutos rojo maduro .....	185
3-14. Superficie foliar .....	186
3-15. Peso fresco y seco y contenido de agua de hoja y tallo .....	187

<b>3-16.</b> Densidad de estomas presentes en el haz y envés de hojas en dos estadios del desarrollo .....	188
<b>3-17.</b> Densidad de tricomas presentes en el haz y envés de hojas en dos estadios del desarrollo .....	189
<b>3-18.</b> Densidad de células del pavimento del haz y envés de hojas en dos estadios del desarrollo .....	190

## **Anexos**

<b>AIV-1.</b> Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios y tejidos de fruto de tomate para cada uno de los genes <i>CHS</i> .....	261
<b>AIV-2.</b> Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios y tejidos de fruto de tomate para cada uno de los genes <i>CHI</i> .....	262
<b>AIV-3.</b> Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios y tejidos de fruto de tomate para cada uno de los genes <i>F3H</i> y <i>FLS</i> .....	263
<b>AIV-4.</b> Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de hoja de tomate para cada uno de los genes <i>CHS</i> .....	264
<b>AIV-5.</b> Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de hoja de tomate para cada uno de los genes <i>CHI</i> .....	265
<b>AIV-6.</b> Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de hoja de tomate para cada uno de los genes <i>F3H</i> y <i>FLS</i> .....	266
<b>AIV-7.</b> Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de raíz de tomate para cada uno de los genes <i>CHS</i> .....	267
<b>AIV-8.</b> Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de raíz de tomate para cada uno de los genes <i>CHI</i> .....	268
<b>AIV-9.</b> Cantidad relativa de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de raíz de tomate para cada uno de los genes <i>F3H</i> y <i>FLS</i> .....	269

## ÍNDICE DE TABLAS

### Introducción general

I-1. Principales países productores de tomate en 2013 .....	6
I-2. Principales cultivos hortícolas producidos en España en 2013 ..	6
I-3. Principales componentes de las ceras cuticulares .....	15

### Materiales y métodos

M-1. Composición de la solución nutritiva Hoagland ½ modificada para el cultivo de tomate .....	45
M-2. Composición de macronutrientes de las soluciones nutritivas con distintas concentraciones de nitrógeno .....	46
M-3. Condiciones de amplificación empleadas para el estudio de los niveles de expresión génica .....	65

### Capítulo 2

2-1. Evolución del diámetro del fruto a lo largo del desarrollo en frutos procedentes de plantas de MM control y plantas homocigotas <i>CHIox</i> y <i>CHI/FNSox</i> .....	119
2-2. Grosor y grado de invaginación de la cutícula de fruto de tomate en cuatro estadios del desarrollo .....	130
2-3. Cantidad de cutícula y de sus principales componentes, de frutos procedentes de plantas de MM control y plantas homocigotas <i>CHIox</i> y <i>CHI/FNSox</i> cultivadas en verano .....	132
2-4. Cantidad de cutícula y de sus principales componentes de frutos de plantas de <i>CHIox</i> homocigotas y hemicigotas cultivadas en verano .....	133
2-5. Cantidad de cutícula y de sus principales componentes de frutos de plantas de <i>CHI/FNSox</i> homocigotas y hemicigotas cultivadas en verano .....	134
2-6. Parámetros biomecánicos de las cutículas aisladas .....	139

### Capítulo 3

3-1. Grosor y grado de invaginación de la cutícula de fruto de tomate procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno .....	177
--	-----

<b>3-2.</b> Cantidad de cutícula y de sus principales componentes de frutos de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno .....	178
<b>3-3.</b> Evolución del diámetro del fruto a lo largo del desarrollo en frutos procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno .....	180
 <b>Anexos</b>	
<b>Anexo I.</b> Secuencias de los cebadores usados para el análisis de expresión mediante qPCR de genes del metabolismo de flavonoides y de los genes de referencia .....	251
<b>Anexo II.</b> Secuencias de los cebadores empleados en los trabajos descritos en los capítulos 2 y 3 de la presente memoria para el análisis de expresión mediante qPCR .....	255
<b>Anexo III.</b> Especies estudiadas en el análisis de proteínas CHS, CHI y F3H .....	257
<b>Anexo V.</b> Expresión de los distintos miembros de las familias génicas <i>CHALCONA SINTASA (CHS)</i> , <i>CHALCONA ISOMERASA (CHI)</i> , <i>FLAVANONA 3 HIDROXILASA (F3H)</i> y <i>FLAVONOL SINTASA (FLS)</i> en tejidos de raíz, hoja y fruto en diferentes estadios del desarrollo .....	272
<b>AVI-1.</b> Cantidad de cutícula y de sus principales componentes, de frutos procedentes de plantas MM control y plantas homocigotas <i>CHI</i> <sub>ox</sub> y <i>CHI/FNS</i> <sub>ox</sub> de invierno .....	283
<b>AVI-2.</b> Cantidad de cutícula y de sus principales componentes, de frutos procedentes de plantas <i>CHI</i> <sub>ox</sub> homocigotas y hemicigotas de invierno .....	284
<b>AVI-3.</b> Cantidad de cutícula y de sus principales componentes, de frutos procedentes de plantas <i>CHI/FNS</i> <sub>ox</sub> homocigotas y hemicigotas de invierno .....	285



# ABREVIATURAS

*"Una ciencia, es decir, un conocimiento  
imaginario de la verdad absoluta"*

*León Tolstoi*





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

4CL	4-cumarato:coenzima A ligasa
A	Área del fruto (m <sup>2</sup> )
12 mM N	Solución nutritiva con una concentración de nitrógeno de 12mM
6 mM N	Solución nutritiva con una concentración de nitrógeno de 6mM
3 mM N	Solución nutritiva con una concentración de nitrógeno de 3mM
ABC	Transportadores del tipo ABC
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ANOVA	Análisis de la varianza con un factor
ANS	Antocianidina sintasa
AP2	APETALA2
ARN	Ácido ribonucleico
AV	Acidez valorable
BA	Brote apical
<i>BDG</i>	<i>BODYGUARD</i>
bHLH	Factores de transcripción con estructura hélice-bucle-hélice
C*	Croma o saturación. Parámetro del color
C3H	Cumarato 3-hidroxilasa
C4H	Cinamato 4-hidroxilasa
<i>CD2</i>	<i>Cutin deficient 2</i>
ce	Célula epidérmica
CHI	Chalcona isomesara
<i>CHI/FNS</i> ox	Plantas que sobreexpresan conjuntamente el gen <i>CHALCONA ISOMERASA A</i> (genbank AF233637; gen <i>PhCHI</i> ) de <i>Petunia x hybrida</i> hort. Ex E.Vilm. y el gen <i>FLAVONA SINTASA II</i> (AF156976; gen <i>GhFNS/CYP93B2</i> )
<i>CHI</i> ox	Plantas que sobreexpresan el gen <i>CHALCONA ISOMERASA A</i> (genbank AF233637; gen <i>PhCHI</i> ) de <i>Petunia x hybrida</i> hort. Ex E.Vilm.
CHR	Chalcona reductasa
CHS	Chalcona sintasa
COMT	Cafeato/5 hidroxiferulato O-metil transferasa
Cq	Ciclo de cuantificación. También denominado Ct.
CR	Cantidad relativita
Ct	Ver Cq

cut	Cutícula
CV	Coefficiente de variación
<i>CWPI</i>	<i>CUTICULAR WATER PERMEABILITY 1</i>
dda	Días después de antesis
DFR	Dihidroflavonol reductasa
DNasa	Enzima desoxirribonucleasa
<i>end</i>	Gen endógeno o de referencia
F	Tasa de flujo de agua (kg·s <sup>-1</sup> )
F3H	Flavanona 3-hidroxilasa
F5H	Ferulato 5-hidroxilasa
FAA	Formaldehído/etanol/acético
FAOSTAT	División de estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FLS	Flavonol sintasa
FNS	Flavona sintasa
FT-IR	Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier
Fw	<i>Forward</i> (cebador sentido)
GC/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
<i>GhFNS</i>	Gen <i>FLAVONA SINTASA II</i> (AF156976; gen <i>GhFNS/CYP93B2</i> ) de <i>Gerbera x hybrida</i> hort.
<i>goi</i>	Gen de interés
H3	Tercera hoja contando desde el ápice
H8	Octava hoja contando desde el ápice
HD-Zip-IV	Factor de transcripción del tipo HD-Zip-IV
Ho	Tono o matiz. Parámetro del color
IFS	Isoflavona sintasa
J	Flujo de agua
L*	Luminosidad
LAR	Leucoantocianidina reductasa
MM	<i>Solanum lycopersicum</i> ‘Moneymaker’
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
<i>NPTII</i>	<i>Neomicina fosfotransferasa II</i>
P	Pintón
PAL	Fenilalanina amonio liasa
pc	Pared celular
PF	Peso fresco
<i>PhCHI</i>	Gen <i>CHALCONA ISOMERASA A</i> (genbank AF233637) de <i>Petunia x hybrida</i> hort. Ex E.Vilm.

PS	Peso seco
qPCR	PCR cuantitativa
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
R	<i>Reverse</i> (cebador antisentido)
R0	Raíces de plántulas 96 h después de la germinación
R5	Raíces de plantas con cinco hojas verdaderas
RM	Rojo maduro
RNasa	Enzima ribonucleasa
SD	Desviación estándar
SE	Error estándar
SGN	Base de datos <i>Sol Genomics Network</i>
<i>SHN</i>	<i>SHINE1/WIN1</i>
STS	Estilbeno sintasa
UV	Ultravioleta
VI	Verde inmaduro
VM	Verde maduro
y	Mutación <i>colorless fruit epidermis</i> de tomate



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# RESUMEN

*"La mayoría de las ideas fundamentales de la ciencia son esencialmente sencillas y, por regla general pueden ser expresadas en un lenguaje comprensible para todos"*

*Albert Einstein*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Estudios previos de nuestro grupo de trabajo realizados en frutos de tomate que tienen modificada la ruta de síntesis de flavonoides como consecuencia del silenciamiento del gen *CHALCONA SINTASA (CHS)* han mostrado que los flavonoides son los principales responsables de la rigidez de la cutícula lo cual provoca una mayor fragilidad de ésta ante la presión interna que soporta durante el crecimiento del fruto y consecuentemente, se produce un mayor agrietado y/o microrrayado. De ahí que el principal objetivo de este trabajo haya sido avanzar en el conocimiento de la ruta de síntesis de flavonoides en la planta de tomate y, más concretamente, estudiar la interacción de estos compuestos con la cutícula del fruto y su repercusión en la calidad.

En primer lugar, con el objetivo de conocer el patrón de expresión en la planta de tomate a lo largo del desarrollo, se seleccionaron tres familias de la ruta de biosíntesis de flavonoides. Las familias génicas seleccionadas fueron *CHS*, *CHI* y *F3H* mientras que los diferentes tejidos elegidos fueron fruto, hoja y raíz, material que se recolectó en diferentes estadios de desarrollo (cuatro estadios para fruto y dos estadios para hoja y raíz). En el caso del fruto es destacable la expresión en el epicarpo en estadio pintón de los genes *CHS2*, *CHS1* y *CHI4* presentando éstos valores muy superiores en comparación con el resto de los genes. En cuanto a la expresión de la familia *F3H* en fruto, destacó la expresión de los genes *F3H1* y *F3H2* al inicio del desarrollo. Al igual que en el fruto, en la hoja vuelven a ser los mismos genes los que presentaron una alta expresión mientras que en la raíz los genes *CHS2*, *CHI6*, *CHI7*, *F3H2* y *F3H4-FLS* fueron los que mostraron los valores de expresión más altos. Adicionalmente se realizó una comparación entre el cálculo de las eficiencias de los cebadores obtenidas mediante la recta de calibrado con las obtenidas mediante las curvas de amplificación con el programa LinReg siendo los valores de ambos métodos bastantes similares.

Debido a la importancia que tienen los flavonoides en la dieta animal muchos trabajos se han centrado en intentar mejorar las propiedades nutricionales de los frutos modificando tanto la cantidad como el tipo de flavonoide. Estos estudios han mostrado que dicha modificación afecta a otros parámetros y características del fruto como, por ejemplo, la resistencia a patógenos (*Botrytis cinerea*), la vida poscosecha debido a cambios en la permeabilidad de la cutícula, el agrietado y a la cantidad de la cutícula. Para conocer la relación entre las rutas de síntesis de flavonoides y de la cutícula

se llevó a cabo un estudio de la expresión de genes claves de ambas rutas junto con una caracterización anatómico-fisiológica en plantas que sobreexpresan el gen *CHALCONA ISOMERASA* de petunia y en plantas que sobreexpresan dicho gen junto al gen *FLAVONA SINTASA II* de gerbera modificando así el perfil de flavonoides a nivel de planta completa. Este estudio permitió comprobar cómo la variación en la cantidad y el tipo de flavonoides acumulados llevó asociados cambios en el peso y la calidad, tanto externa como interna, del fruto. Los cambios en la calidad externa fueron debidos a las variaciones en la morfología y la composición química de la cutícula, las cuales conllevaron variaciones en las propiedades mecánicas de la misma aumentando su fragilidad ante la presión interna durante el crecimiento del fruto. Además, con la modificación de la ruta de síntesis de los flavonoides aumentó la cantidad de cutícula. Dicho aumento no pudo asociarse con cambios en la expresión de ninguno de los genes conocidos relacionados con la cutícula con la excepción del factor de transcripción *MYB41*. Por otro lado, se ha comprobado que la chalconaringenina fue el único flavonoide que se acumuló en la cutícula del fruto de tomate durante la maduración.

Paralelamente, se estudió la influencia del nitrógeno en el metabolismo de los flavonoides y su relación con la cutícula. Para ello se cultivaron las plantas con tres soluciones de riego que difieren en el aporte de nitrógeno. Se ha podido comprobar con este estudio que el cultivo de plantas de tomate con un menor aporte de nitrógeno estuvo asociado a un aumento de la cantidad de flavonoides en la cutícula y a una mejora en la calidad externa del fruto al disminuir la tasa de agrietado sin afectar a la calidad interna o a la producción. La disminución del suministro de N tendría dos efectos inmediatos asociados al cultivo del tomate: contribuiría de manera significativa a la reducción de los desechos de aguas nitrogenadas, reduciendo notablemente la contaminación de las aguas y los suelos, y disminuiría el coste de producción.

# INTRODUCCIÓN GENERAL

*"Para entender una ciencia es necesario  
conocer su historia"*  
*Auguste Comte*





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## El cultivo de tomate

### *Taxonomía y origen de la especie*

El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia *Solanaceae* que incluye más de 3000 especies, algunas de gran importancia económica, como la patata, el pimiento, la berenjena, petunia o el tabaco (Foolad, 2007). El género *Solanum* es el más numeroso de esta familia, con unas 1500 especies (Peralta *et al.*, 2008).

La clasificación taxonómica del tomate ha ido cambiando a lo largo de los años. Desde la introducción de la planta de tomate en Europa, los botánicos reconocieron su relación con el género *Solanum*. Anguillara en 1561 identificó el tomate como la planta descrita por Galeno en el siglo II denominada *Lycopersicon* (Peralta y Spooner, 2006). Más de un siglo después, fue Tournefort (1694) el primero en considerar que el tomate cultivado no pertenecía al género *Solanum* y lo encuadró en uno distinto al que denominó *Lycopersicon*, siguiendo el nombre previamente asignado por Anguillara. Sin embargo, Linneo (1753) en su obra *Species Plantarum*, y en contra de la tendencia de la época, clasificó al tomate dentro del género *Solanum* bajo el nombre de *Solanum lycopersicum*. Un año después, Miller (1754), siguiendo el criterio de Tournefort, definió formalmente el género *Lycopersicon*, aunque no fue hasta 1768 que clasificó el tomate como *Lycopersicon esculentum* al definir la especie tipo. Recientemente se ha revisado la clasificación del tomate en base a datos morfológicos y moleculares y se ha vuelto a colocar dentro del género *Solanum*, como ya hizo en su día Linneo (Spooner *et al.*, 2005; Peralta *et al.*, 2006).

Las especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado se agrupan en la sección *Lycopersicon* formando un clado (Peralta y Spooner, 2005). Dentro de esta sección se incluyen 12 especies silvestres (Peralta *et al.*, 2008) entre las que se distinguen tres de fruto rojo, *Solanum pimpinellifolium* L., *Solanum galapagense* S. C. Darwin & Peralta y *Solanum cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg, estas dos últimas endémicas de las islas Galápagos, y nueve de fruto verde. Las especies de fruto verde son *Solanum pennellii* Correll, *Solanum habrochaites* S. Knapp & D. M Spooner, *Solanum chilense* (Dunal) Reiche, *Solanum huaylasense* Peralta, *Solanum peruvianum* L., *Solanum corneliomulleri* J. F. Macbr., *Solanum arcanum* Peralta, *Solanum*

*chmielewskii* (C. M. Rick *et al.*) D. M. Spooner *et al.*, y *Solanum neorickii* D. M. Spooner *et al.*

Las especies de la sección *Lycopersicon* se localizan principalmente en la región andina que comprende desde el sur de Colombia al norte de Chile y desde la costa del Pacífico (incluidas las islas Galápagos) a las estribaciones orientales de los Andes, incluyendo Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995). Aún hoy no está claro dónde tuvo lugar la domesticación del tomate aunque dos son las hipótesis más aceptadas al respecto. Por un lado, deCandolle (1886) sostenía que fue Perú el lugar de domesticación basándose en criterios botánicos, históricos, filológicos y arqueológicos. Por otro, Jenkins (1948) entendía que México era el centro de origen basándose en que no había evidencias de domesticación precolombina del tomate en Sudamérica pero sí amplias en México. Adicionalmente argüía que el vocablo *tomatl* (nombre náhuatl del tomate) estaba integrado en la cultura azteca. No obstante, hay que tener en cuenta que este vocablo lo empleaban los aztecas para referirse de modo genérico a plantas con frutos globosos o bayas y sobre todo a *Physalis philadelphica* Lam. o tomate de cáscara (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995; Peralta y Spooner, 2006; Bauchet y Causse, 2012). El estudio comparativo de entradas de tomate procedentes de México y Sudamérica ha mostrado que comparten isoenzimas (Rick y Forbes, 1975) y marcadores moleculares similares (Villand *et al.*, 1998), lo que no apoya la hipótesis mexicana si bien tampoco se considera una evidencia concluyente a favor de la hipótesis peruana (Bauchet y Causse, 2012). Actualmente se considera que el lugar de domesticación del tomate no está resuelto y que podría haberse dado una domesticación independiente en ambas regiones (Peralta y Spooner, 2006; Bauchet y Causse, 2012).

Tradicionalmente se ha considerado que la forma ancestral del tomate cultivado es muy probablemente *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Alef.) Voss, el cual crece espontáneamente en las regiones tropicales y subtropicales de América (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995). Empero, el estudio genético de esta variedad mostró que la mayoría de las entradas son una mezcla de tomates silvestres y cultivados en vez del ancestro de las formas cultivadas (Nesbitt y Tanksley, 2002; Peralta *et al.*, 2008). Más recientemente se ha realizado un estudio de variabilidad genética empleando numerosas entradas de *S. lycopersicum*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y *S. pimpinellifolium*, la especie silvestre más cercana al tomate cultivado (Blanca

*et al.*, 2012). Los resultados indican que un gran número de entradas de la variedad *cerasiforme* son una mezcla entre el tomate cultivado y *S. pimpinellifolium*; no obstante, aquellas que no son mezclas podrían ser similares al ancestro a partir del cual se originó el tomate cultivado. Así, los autores proponen una hipótesis de domesticación en dos tiempos, con una predomesticación que habría tenido lugar en la región andina seguida de una auténtica domesticación en Mesoamérica (Blanca *et al.*, 2012).

El primer contacto de los europeos con el tomate fue posiblemente tras la toma de Tenochtitlán en 1521 por Hernán Cortés. El tomate ya formaba parte de la dieta y cultura aztecas y pocos años después, las crónicas indican que también pasó a formar parte de la dieta de los españoles que vivían en el Nuevo Mundo. El tomate se introdujo en Europa poco después de la conquista de México; en 1544 Pietro Andrea Mattioli menciona el consumo de tomate en Italia. Este consumo se desplazó lentamente hacia el Norte de Europa, donde hasta bien entrado el siglo XVII se empleaba tan sólo como planta ornamental debido a su proximidad botánica con plantas venenosas como la belladona y la mandrágora. El desarrollo de programas de mejora para la obtención de variedades con distintos tamaños y formas se inició en el siglo XIX y el cultivo ganó en importancia económica (Bauchet y Causse, 2012) ayudado también por el establecimiento de nuevas rutas de comercialización y nuevas colonias que permitieron su expansión mundial (Díez y Nuez, 2008).

### *Importancia económica*

El tomate es una hortaliza de gran importancia a nivel mundial en cuanto a su cultivo, producción y comercio. Según los últimos datos publicados por FAOSTAT (División de estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) el tomate ocupa el quinto lugar entre las hortalizas de mayor producción en el mundo y el segundo de acuerdo con su valor de mercado (FAOSTAT, 2013; <http://faostat3.fao.org>). La producción mundial de tomate en el año 2013 alcanzó los 164 millones de toneladas. El principal país productor de tomate fresco fue China, ocupando España el noveno puesto con una producción de 3.683.600 toneladas y un valor de mercado que superó los 1.300 millones de dólares internacionales (Tabla I-1). España fue el tercer país exportador de tomate con 1.004.009 t, por detrás de México y los Países Bajos (FAOSTAT, 2013).

**Tabla I-1.** Clasificación de los principales países productores de tomate en 2013. Se indica la producción (toneladas) y su valor (dólares internacionales\*). Datos tomados de FAOSTAT (<http://faostat3.fao.org>).

<b>País</b>	<b>Producción (t)</b>	<b>Valor producción (\$Int*)</b>
China	50.552.200	18.682.273.240
India	18.227.000	6.736.043.030
Estados Unidos	12.574.550	4.647.101.000
Turquía	11.820.000	3.712.971.760
Egipto	8.533.803	3.153.786.370
Irán	6.174.182	2.281.755.400
Italia	4.932.463	1.822.860.760
Brasil	4.187.646	1.547.603.210
España	3.683.600	1.305.891.350
México	3.282.583	1.231.124.500

\*Un dólar internacional (\$Int) es una unidad monetaria hipotética calculada por el Banco Mundial a partir de la paridad del poder adquisitivo.

**Tabla I-2.** Clasificación de los principales cultivos hortícolas producidos en España en 2013. Se indica la producción (toneladas) y su valor (dólares internacionales\*). Datos tomados de FAOSTAT (<http://faostat3.fao.org>).

<b>Cultivos</b>	<b>Producción (t)</b>	<b>Valor producción (\$Int*)</b>
Aceituna	9.250.000	6.306.176.690
Trigo	7.602.600	230.771.950
Uva	7.480.000	4.275.695.160
Tomate	3.683.600	1.305.891.350
Naranja	3.394.100	655.936.980
Remolacha	2.468.700	106.188.660
Patata	2.199.600	329.055.440
Mandarina	2.198.900	543.176.680
Melocotón	1.329.800	723.963.070
Cebolla	1.186.600	249.225.160

\*Un dólar internacional (\$Int) es una unidad monetaria hipotética calculada por el Banco Mundial a partir de la paridad del poder adquisitivo.

A nivel nacional, en 2013 el tomate ocupó el cuarto puesto dentro de los principales cultivos en cuanto a producción y el tercero en cuanto al valor de su producción, tan sólo por detrás de productos como la aceituna y la uva (Tabla I-2). Igualmente, el tomate fue el cuarto producto exportado a nivel



español con una producción de 1.004.009 t (FAOSTAT, 2013; <http://faostat3.fao.org>).

La superficie destinada al cultivo del tomate en España alcanzó en 2015 las 43.097 ha con una producción media de 84.775 kg/ha (MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, <http://www.magrama.gob.es/>). Extremadura y Andalucía fueron las comunidades autónomas que mayor superficie dedicaron con 21.832 y 13.928 ha, respectivamente. En Extremadura la mayor parte de la superficie de cultivo estuvo destinada al tomate de industria mientras que Andalucía lideró el cultivo en campo y en invernadero con 1.590 y 3.561 ha, respectivamente.

En el ámbito de la investigación la planta de tomate se ha convertido en un organismo modelo para el estudio de frutos de tipo baya, tanto en estudios básicos como aplicados. Esto ha ocurrido merced a una serie de características relacionadas con su fisiología y su genética. El tomate presenta un ciclo de vida relativamente corto y es insensible al fotoperiodo durante la floración, lo que le permite producir semillas independientemente de las condiciones de luz. Además, presenta una elevada tolerancia a un amplio rango de condiciones ambientales, lo que permite el estudio del efecto de diferentes estreses abióticos. Al ser una planta autógama tiende fácilmente a la homocigosis, lo cual permite una fácil detección de mutaciones recesivas, además de hibridar bien en condiciones controladas. Posee un genoma relativamente pequeño, 900 megabases, recientemente secuenciado (The Tomato Genome Consortium, 2012), con escasa duplicación génica. A estas características hay que sumar su facilidad para propagarse asexualmente a través de esquejes o de injertos (Bergounoux, 2014). Adicionalmente, los esfuerzos que se han dedicado a recolección y conservación de germoplasma han permitido que actualmente haya más de 83.000 entradas de tomate conservadas en bancos de semillas (FAO, 2010). A esto hay que añadir la existencia de una amplia colección disponible de mutantes, espontáneos e inducidos, que constituye una fuente de recursos importante para la mejora así como para el estudio de la función de diversos genes (Lozano *et al.*, 2009).

El avance en el diseño de marcadores acompañado de la generación de diferentes poblaciones procedentes de cruces intra- e interespecíficos, ha permitido también un rápido avance en la identificación de genes de interés y

su introducción en variedades de élite a partir de especies silvestres. Además, el desarrollo de mapas genéticos de alta densidad asegura que se ha examinado gran parte del genoma uniformemente, lo cual es muy importante cuando se trata de detectar e introducir caracteres cuantitativos (Foolad, 2007).

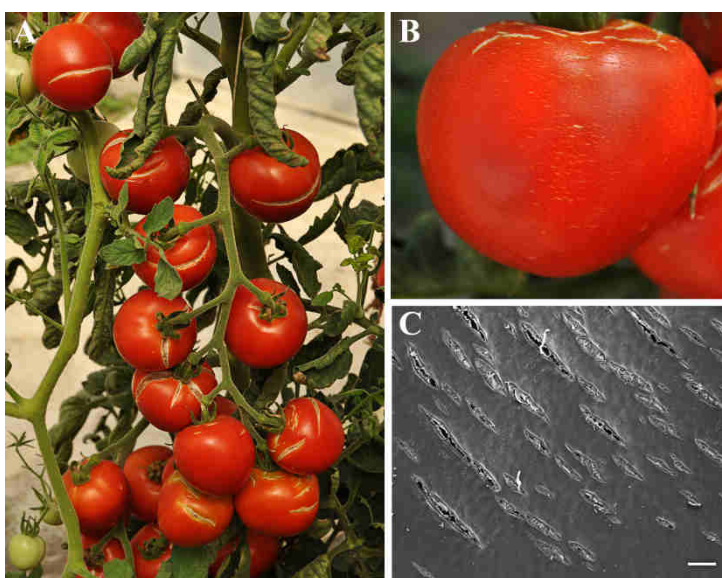
El uso del tomate como planta modelo ha permitido avanzar en el conocimiento de diversos aspectos relacionados con la anatomía (Gillaspy *et al.*, 1993), el crecimiento y la maduración del fruto (Seymour *et al.*, 2013), la composición y cambios estructurales de la pared celular (Lunn *et al.*, 2013) así como en el desarrollo y propiedades de la cutícula vegetal (Domínguez *et al.*, 2011a; Martin y Rose, 2014). Este último aspecto ha jugado un papel importante en el estudio del agrietado, una fisiopatía que aparece durante el desarrollo de algunos tipos de frutos y que provoca grandes pérdidas económicas (Dorais *et al.*, 2004).

### *Agrietado*

El agrietado o rajado de los frutos es una fisiopatía que afecta a diversos cultivos de fruto carnoso manifestándose como una rotura del pericarpo durante el crecimiento y desarrollo o bien durante la maduración. Estas grietas suelen ir acompañadas de pérdida de agua, crecimiento de patógenos, o simplemente de una apariencia externa rechazada por los consumidores, lo que conduce al descarte de estos frutos y consecuentemente a pérdidas económicas considerables. Algunas de las frutas que se ven afectadas por esta fisiopatía son la manzana (Opara *et al.*, 1997), la cereza (Andersen y Richardson, 1982), el pimiento (Aloni *et al.*, 1998), el litchi (Huang *et al.*, 1999), la uva (Considine y Kriedmann, 1972), el melocotón (Williams *et al.*, 1992), los cítricos (García-Luis *et al.*, 1994; Josan *et al.*, 1995), el mango (Bally, 1999) y el tomate (Frazier y Bowers, 1947; Young, 1947), entre otras.

El agrietado puede clasificarse en macro y microagrietado según la longitud y profundidad de las grietas. Así, el macroagrietado se caracteriza por la presencia de grietas de varios centímetros de longitud, que en los casos más severos pueden abarcar toda la longitud o anchura del fruto, y cuya profundidad puede atravesar todo el pericarpo y llegar al lóculo (Figura I-1A). Dentro del macroagrietado algunos autores diferencian el agrietado concéntrico, con grietas circulares alrededor de la cicatriz peduncular, y el

radial, donde las grietas parten de la cicatriz peduncular hacia la pistilar (Dorais *et al.*, 2004). En el caso específico del tomate, el macroagrietado puede aparecer durante el crecimiento y desarrollo del fruto, en cuyo caso las grietas suberifican para impedir la pérdida de agua y el crecimiento de microorganismos, y también durante la maduración. En este último caso las grietas rara vez suberifican y los tejidos internos quedan expuestos. El agrietado durante el crecimiento es frecuente en los tomates de tamaño mediano o grande mientras que el agrietado en la maduración es característico de los tomates de tipo cereza.



**Figura I-1.** A, tomates en racimo agrietados. B, fruto de tomate microrrayado. C, imagen de microscopía electrónica de barrido donde se aprecian las microgrietas en la superficie de un fruto de tomate, barra 100  $\mu\text{m}$ . Fotografías Dra E. Domínguez.

Por su parte, el microagrietado (también denominado microrrayado) afecta a la pared celular externa de la epidermis y, en los casos más severos, a las células epidérmicas e incluso alguna capa del colénquima (Emmons y Scott, 1998a). Las grietas suelen tener una extensión de milímetros, aunque la acumulación de microgrietas cercanas puede provocar la sensación visual de grietas más largas (Figura I-1B,C). Estas grietas pueden llegar a suberificar cuando la integridad celular se ve comprometida. En el caso del tomate suele aparecer durante la maduración, aunque en condiciones de alta humedad

relativa pueden manifestarse desde estadios iniciales del crecimiento del fruto.

El agrietado se produce como consecuencia del fallo mecánico de los tejidos del fruto. La presión a la que se ven sometidas las células durante el periodo de expansión es superior a la resistencia mecánica de las paredes celulares para así favorecer el crecimiento (Considine y Brown, 1981). De igual manera, durante la maduración hay un ablandamiento de las paredes celulares que produce el debilitamiento mecánico de las mismas (Seymour *et al.*, 2002), junto con un aumento de la presión interna procedente del lóculo (Almeida y Huber, 2001). Como consecuencia, los estreses mecánicos, que son siempre máximos en la superficie (Niklas, 1992), se transmiten directamente hacia la epidermis y la cutícula, de tal manera que se ha descrito una relación entre la composición de la cutícula, sus propiedades mecánicas y el agrietado (Matas *et al.*, 2005; Domínguez *et al.*, 2009; 2011b). De este modo, no sólo el ablandamiento de las paredes celulares contribuiría al agrietado (Thiagu *et al.*, 1993) sino que además una falta de sincronía entre la expansión celular y la deposición de la cutícula podría contribuir también a la aparición de las grietas (Knoche *et al.*, 2004; Knoche y Peschel, 2007a; Khanal *et al.*, 2011).

El agrietado del tomate es una fisiopatía compleja con una componente genética importante (Cuartero *et al.*, 1981) además de una componente ambiental (Ohta *et al.*, 1991). Diversos estudios genéticos parecen indicar que el agrietado es un carácter cuantitativo controlado, al menos, por dos o tres genes y que presenta además una heredabilidad baja (Young, 1959; Cuartero *et al.*, 1981; Peet, 1992; Emmons y Scott, 1998b). Más recientemente, Hovav *et al.* (2007) identificaron *Cwp1* (*CUTICULAR WATER PERMEABILITY 1*) un gen de *S. habrochaites* que al ser introgresado en el tomate cultivado produce microrrayado y una deshidratación rápida del fruto, pero que sólo se expresa en las especies silvestres de tomate de fruto verde.

Con respecto a las condiciones ambientales, la temperatura y la humedad relativa se consideran los principales factores determinantes de la incidencia del agrietado (Dorais *et al.*, 2004). Se postula que la elevada temperatura provocaría un aumento de presión en el interior del fruto favoreciendo su rotura (Corey y Tan, 1990, Peet, 1992). Por otro lado, otros autores asocian la elevada temperatura a una mayor radiación solar (Cockshull *et al.*, 1992) que

aumentaría el contenido de fotoasimilados y la tasa de crecimiento del fruto ocasionando eventualmente el rajado de los mismos (Ehret *et al.*, 1993; Emmons y Scott, 1997). En este sentido se ha demostrado una relación entre la velocidad de crecimiento del fruto de tomate y la tasa de agrietado (Domínguez *et al.*, 2012). Por su parte, la elevada humedad relativa aumentaría el flujo de agua y solutos hacia el fruto favoreciendo el agrietado (Aloni *et al.*, 1999; Leonardi *et al.*, 2000; Demers *et al.*, 2007). Se ha demostrado que las condiciones de elevada temperatura y humedad relativa afectan a la síntesis de cutícula (Domínguez *et al.*, 2012) así como a sus propiedades biomecánicas, las cuales se ven comprometidas (Matas *et al.*, 2005). Concretamente, los flavonoides presentes en la cutícula han demostrado jugar un papel muy importante en su resistencia mecánica y la disminución del agrietado (Domínguez *et al.*, 2009; España, 2012; España *et al.*, 2014b).

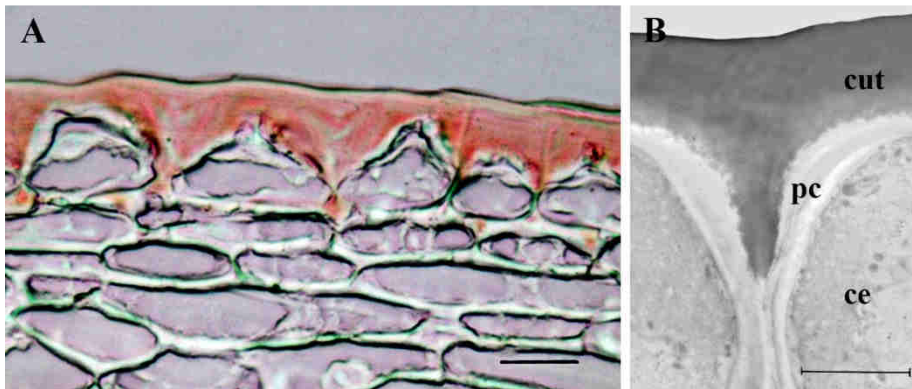
Algunas de las prácticas culturales que se han empleado para disminuir la incidencia del agrietado son el aumento de la conductividad eléctrica del agua de riego (López-Casado, 2006), la aplicación de calcio (Brown *et al.*, 1995; Lichter *et al.*, 2002; Álvarez-Herrera *et al.*, 2010) y la defoliación de las plantas para disminuir la humedad relativa y al mismo tiempo la velocidad de crecimiento de los frutos al reducir la disponibilidad de fotoasimilados (Ehret *et al.*, 1993; Demers *et al.*, 2007).

### **La cutícula vegetal**

#### *Composición, estructura y funciones*

La cutícula vegetal es una membrana de naturaleza fundamentalmente lipídica que se encuentra localizada en la parte superior de la pared celular externa de las células epidérmicas (Figura I-2) (Domínguez *et al.*, 2011a). Está presente en los órganos aéreos de las plantas tales como hojas, tallos, frutos y diversas partes de las flores (pétalos, sépalos, estigma), estando ausente en las raíces. La cutícula aparece en estadios muy iniciales del desarrollo embrionario, habiéndose descrito la presencia de una capa lipídica en el cigoto (Bruck y Walker, 1985; Yang *et al.*, 2008). También se ha descrito la presencia de cutícula rodeando la cubierta de la semilla (Molina *et al.*, 2008; de Giorgi *et al.*, 2015).

E.J.H. Corner (1964) describió la cutícula como una de las cuatro grandes «invenciones» de las plantas y suele considerarse que su aparición jugó un papel instrumental en la conquista de la tierra y del medio aéreo por parte de las mismas (Graham, 1993; Niklas, 2013). La presencia de cutícula ha sido principalmente estudiada en diversas especies de espermatofitas, sobre todo angiospermas, pero los estudios centrados en la cutícula de otros grupos de embriofitas son escasos. Hunneman y Eglinton (1972) se centraron en el estudio de individuos pertenecientes a los distintos grupos de gimnospermas e identificaron en todos los casos la presencia de una cutícula de naturaleza lipídica. Igualmente, se ha identificado la presencia de una cutícula de composición lipídica en individuos de los restantes grupos de embriofitas *i.e.*, hepáticas, musgos, antoceros, lycopodios y helechos (Hunneman y Eglinton, 1972; Caldicott *et al.*, 1975; Caldicott y Eglinton, 1976; Cook y Graham, 1998; Graham *et al.*, 2004). Estos resultados parecen indicar que la presencia de una cutícula es común a todas las embriofitas, si bien sería necesario estudiar un mayor número de especies e individuos.

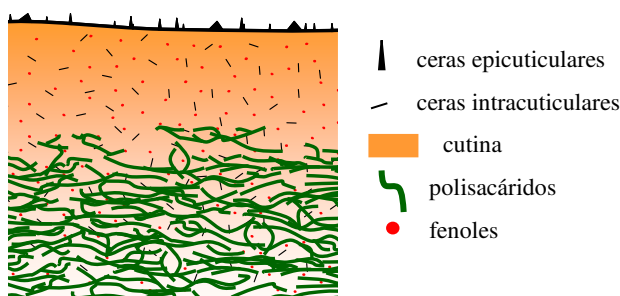


**Figura I-2.** A, microfotografía de un corte transversal de pericarpio de tomate inmaduro. En naranja se aprecia la cutícula teñida con Sudán IV. Barra 20  $\mu\text{m}$ . B, imagen de microscopía electrónica de transmisión de la epidermis de un fruto de tomate inmaduro. cut: cutícula, pc: pared celular, ce: célula epidérmica. Barra 5  $\mu\text{m}$ . Imágenes tomadas de Domínguez *et al.* (2011a).

La cutícula se ha clasificado tradicionalmente en función de su ultraestructura identificándose hasta seis tipos (Holloway, 1982; Jeffree, 2006) dependiendo de la presencia o ausencia, intensidad y persistencia durante el desarrollo de estructuras laminadas y reticuladas. Así, en microscopía electrónica de transmisión, se pueden distinguir cutículas laminadas donde se alternan capas osmiofílicas con capas transparentes a los

electrones (ej. *Beta vulgaris* L.), cutículas reticuladas donde se observa material fibrilar osmiofílico con distinta orientación (ej. *Malus pumila* Mill.), cutículas amorfas donde no se observa ningún tipo de patrón (ej. *Solanum lycopersicum* L.) y combinaciones de las anteriores (ej. *Apium graveolens* (Mill.) Pers., *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Está por determinar si esta gran variedad de tipos estructurales tiene relevancia funcional y, de ser así, cuál sería (Jeffree, 2006).

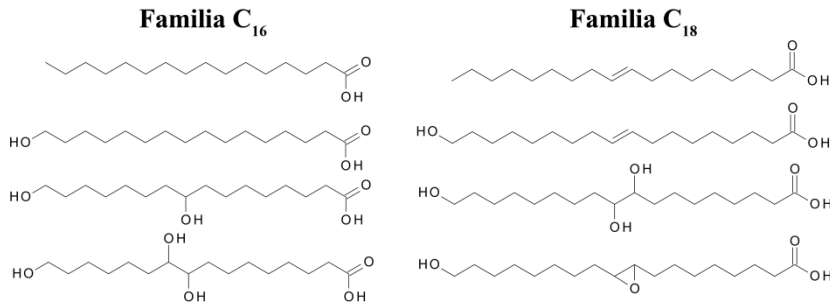
El grosor de la cutícula vegetal es muy variable, pudiéndose encontrar cutículas con menos de  $0,03\ \mu\text{m}$  y otras con más de  $10\ \mu\text{m}$ , y su peso puede oscilar entre los 20 y más de  $3000\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  dependiendo de la especie, órgano y estadio del desarrollo (Heredia, 2003). Los mayores grosores y cantidades de cutícula suelen presentarse en frutos mientras que en hojas la cantidad por unidad de superficie es, por término general, menor y más delgada (Jeffree, 2006). El grosor no es constante a lo largo de la superficie de un órgano, sino que disminuye en la zona central de las paredes periclinales de las células epidérmicas y se proyecta al interior en las paredes anticlinales (Figura I-2). La deposición de cutícula puede no limitarse a la pared celular externa y paredes anticlinales de las células epidérmicas, sino que, en algunos casos como el fruto de tomate, la cutícula puede llegar a impregnar las paredes celulares de una o varias capas de colénquima (Esau, 1977; Holloway, 1982).



**Figura I-3.** Esquema de un corte transversal de la cutícula vegetal. Imagen tomada de Domínguez *et al.* (2011a).

La composición de la cutícula es heterogénea y presenta una disposición claramente anisotrópica (Figura I-3). La cutícula está formada principalmente por el biopolímero cutina, polisacáridos procedentes de la pared celular, ceras y compuestos fenólicos (Figura I-3) (Domínguez *et al.*, 2011a). La cutina es el componente mayoritario, pudiendo llegar a constituir un 40-80% del peso de la misma. Se trata de un poliéster de estructura amorfa formado a partir de

polihidroxiácidos grasos de cadena larga pertenecientes a las familias C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub> (Domínguez *et al.*, 2015a). En función de la longitud de cadena de los ácidos grasos mayoritarios que la componen se identifican tres tipos de cutina según pertenezcan a la familia C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub> o sean una mezcla de ambas. La Figura I-4 muestra la estructura química de los principales ácidos grasos de la cutina. El componente mayoritario de la cutina C<sub>16</sub> es el ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico junto con su isómero posicional 9,16-dihidroxihexadecanoico; sólo en algunos casos están presentes los ácidos 16-hidroxi-10-oxo- C<sub>16</sub> y 16-oxo-9 ó 10-hidroxi- C<sub>16</sub>. Por otro lado, las cutinas C<sub>18</sub> están compuestas principalmente por los ácidos 18-hidroxi-9,10-epoxioctadecanoico y 9,10,18-trihidroxi-9,10-epoxioctadecanoico junto con sus homólogos monoinsaturados (Heredia, 2003). La planta modelo *A. thaliana* es un caso excepcional donde los ácidos  $\alpha,\omega$ -dicarboxílicos son los principales constituyentes de la cutina (Franke *et al.*, 2005). En algunas especies se ha identificado la presencia de cután, otro polímero alifático procedente de ácidos grasos poliinsaturados unidos por puentes éter (Villena *et al.*, 1999). El cután suele estar presente en combinación con la cutina (Nip *et al.*, 1986a), salvo alguna excepción como *B. vulgaris* donde es el único polímero lipídico presente en la cutícula (Nip *et al.*, 1986b).



**Figura I-4.** Estructura química de los principales componentes de la cutina. Imagen tomada de Heredia-Guerrero *et al.* (2011).

Las ceras son una mezcla compleja de diversos tipos de compuestos alifáticos de cadena larga tales como cetonas, alcoholes, hidrocarburos, ácidos grasos, ésteres así como terpenos y esteroides (Tabla I-3) (Hamilton, 1995). La cantidad de ceras varía considerablemente entre especies, oscilando entre el 1% de la cantidad total de cutícula hasta más del 25% como en el caso de uva (Casado y Heredia, 1999). Se pueden distinguir dos tipos de ceras en función de su localización en la matriz de cutícula: las ceras



epicuticulares, depositadas en la superficie de la cutícula y que pueden presentar, dependiendo de la especie y órgano, estructuras cristalinas a modo de bastones, discos, escamas, etc. o bien ser amorfas (Jeffree, 2006), y las ceras intracuticulares, embebidas en la matriz de la cutícula (Jeffree, 2006) y consideradas las principales responsables de la resistencia al paso del agua, si bien, dependiendo de la especie y composición química, las ceras epicuticulares pueden contribuir de modo significativo (Jetter y Riederer, 2016).

**Tabla I-3.** Principales componentes de las ceras cuticulares. Modificada a partir de Heredia y Domínguez (2009).

Componente	Estructura química	Rango
Hidrocarburos	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$	$\text{C}_{21} - \text{C}_{35}$
Cetonas	$\text{R}_1\text{COR}_2$	$\text{C}_{25} - \text{C}_{33}$
Alcoholes secundarios	$\text{R}_1\text{CH}(\text{OH})\text{R}_2$	$\text{C}_{29} - \text{C}_{33}$
$\beta$ -dicetonas	$\text{R}_1\text{COCH}_2\text{COR}_2$	$\text{C}_{27} - \text{C}_{33}$
Monoésteres	$\text{R}_1\text{COOR}_2$	$\text{C}_{30} - \text{C}_{60}$
Poliésteres		$M_r 800-1500$
Alcoholes primarios	$\text{RCH}_2\text{OH}$	$\text{C}_{12} - \text{C}_{36}$
Aldehidos	$\text{RCHO}$	$\text{C}_{14} - \text{C}_{34}$
Ácidos carboxílicos	$\text{RCOOH}$	$\text{C}_{12} - \text{C}_{36}$
Terpenos y esteroides		Ácido ursólico, oleanólico

Los polisacáridos de la cutícula son principalmente celulosa y pectina (López-Casado *et al.*, 2007) que provienen de la pared celular primaria y que quedan adheridos a la cutícula durante el proceso de formación de la misma. Finalmente, los compuestos fenólicos están formados principalmente por ácidos *m*- y *p*-cumárico, ferúlico, *p*-hidroxibenzoico y flavonoides, tales como la naringenina y la chalconaringenina (Hunt y Baker, 1980; Baker *et al.*, 1982; Ju y Bramlage, 1999; España *et al.*, 2014a). En el caso de la cutícula del fruto de tomate la proporción de estos compuestos fenólicos depende principalmente del estadio de desarrollo, alcanzando su máximo de acumulación en el fruto maduro (España *et al.*, 2014a). En algunas gimnospermas como *Araucaria bidwillii* Hook. y *Picea abies* (L.) H. Karst. se ha detectado un dominio de lignina importante que puede llegar a representar hasta el 25% del peso total de la cutícula (Kögel-Knabner *et al.*, 1994; Reina *et al.*, 2001).

El concepto de cutícula ha evolucionado a lo largo de los años, desde su primera descripción como una membrana extracelular a modo de barniz que recubre los tejidos vivos de las plantas (von Mohl, 1847) a la más reciente interpretación como parte integrante de la pared celular externa epidérmica que juega un papel importante en el desarrollo de los órganos y en el mantenimiento de la identidad epidérmica (Javelle *et al.*, 2010a; Segado *et al.*, 2016). La naturaleza fundamentalmente hidrofóbica de la cutícula hace que ésta desempeñe un papel fundamental en la protección frente a la pérdida de agua, regulando no sólo el intercambio de agua sino también de CO<sub>2</sub> y solutos entre la planta y el medio ambiente (Kerstiens, 1996a; Riederer y Schreiber, 2001; Schreiber, 2010). Adicionalmente, las características de barrera de la cutícula se manifiestan también en su papel como interfase impidiendo la fusión de órganos durante el desarrollo y contribuyendo al establecimiento y mantenimiento de la identidad epidérmica (Lolle *et al.*, 1997; Tsuwamoto *et al.*, 2008; Javelle *et al.*, 2010b; Takada, 2013; San-Bento *et al.*, 2014; Takada e Iida, 2014). Recientemente se han acumulado evidencias que sugieren que algunos lípidos de la cutícula, principalmente ceras, podrían actuar como moléculas señal, interviniendo en varios procesos asociados con la división y expansión celulares, así como en mecanismos de defensa (Qin *et al.*, 2007; Nobusawa *et al.*, 2013; Raffaele *et al.*, 2009; Reina-Pinto y Yephremov, 2009; Roudier *et al.*, 2010).

Por otro lado, la nanoestructura y naturaleza hidrófoba de las ceras epicuticulares contribuye al llamado efecto loto favoreciendo el mantenimiento de las superficies de las plantas limpias y secas (Koch y Barthlott, 2009). Igualmente, la cutícula, y en especial las ceras epicuticulares, favorecen la reflexión de la luz pudiendo contribuir a la atracción de insectos polinizadores o agentes dispersadores de semillas y asimismo protegiendo las células de la radiación UV (Pfündel *et al.*, 2006). Por otro lado, las ceras epicuticulares contribuyen a la formación de superficies con distinto grado de adherencia que pueden alterar la ecología de los insectos herbívoros (Eigenbrode y Jetter, 2002) o generar superficies altamente deslizantes que funcionan como trampas para los insectos (Gorb *et al.*, 2004).

Finalmente, la cutícula desempeña un importante papel estructural contribuyendo al mantenimiento de la integridad de los órganos y protegiendo del fallo mecánico frente a estreses externos bióticos (hongos,

herbívoros) y abióticos (viento, lluvia, etc.) así como frente a estreses internos (Kerstiens, 1996b; Domínguez *et al.*, 2011b). De igual forma, la cutícula participa en el control del crecimiento de los órganos (Savaldi-Goldstein *et al.*, 2007) y en la regulación de la interacción polen-estigma en las especies con estigma seco (Tanaka y Machida, 2006; Borisjuk *et al.*, 2014). Por último, la cutícula favorece las condiciones para el crecimiento y desarrollo de determinados microorganismos (Leveau, 2006).

### *Síntesis de cutícula*

Dado que la cutícula es un *composite* de naturaleza heterogénea, son muchos los genes que se han identificado involucrados en la síntesis de la misma (Nawrath *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha observado que su deposición está regulada por el desarrollo y por las condiciones ambientales, de tal modo que la cantidad de cutícula y de sus componentes así como su grosor y grado de invaginación se ven modificados por el estadio de desarrollo y por las condiciones lumínicas, hídricas y térmicas en las que se da el crecimiento de la planta (Hull *et al.*, 1975; López-Casado, 2006; Kosma *et al.*, 2009; Domínguez *et al.*, 2008; 2012). Adicionalmente, se ha demostrado un control hormonal relacionado con la síntesis y deposición de cutícula (Knoche y Peschel, 2007b; Curvers *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2010; L'Haridon *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). En conjunto, todos estos factores contribuyen a que la cutícula presente una regulación compleja con un número elevado de genes implicados en la misma.

Una gran parte de los genes involucrados en la síntesis de los ácidos grasos que constituyen los monómeros de cutina y las ceras se han caracterizado a partir de los estudios realizados en *A. thaliana* y gracias a la colección de mutantes disponibles con fenotipos visibles (Pollard *et al.*, 2008; Nawrath *et al.*, 2013). Esto ha permitido la identificación de varias de las enzimas responsables de las modificaciones que sufren los ácidos grasos para dar lugar a los monómeros de cutina y ceras (Li-Beisson *et al.*, 2013). Entre ellas cabe destacar las familias CYP86 y CYP77 de las monoxigenasas P450 como responsables de la  $\omega$ -hidroxilación y de la formación de hidroxilos secundarios, respectivamente, de los ácidos grasos (Xiao *et al.*, 2004; Li-Beisson *et al.*, 2009), la familia LACS (sintetasa que une un grupo CoA a un ácido graso de cadena larga) responsable de la activación de los monómeros

(Bessire *et al.*, 2007; Weng *et al.*, 2010) y las familias KCS ( $\beta$ -cetoacil CoA sintasa), KCR ( $\beta$ -cetoacil CoA reductasa), HCD ( $\beta$ -hidroxiacil CoA deshidratasa) y ECR (enoil CoA reductasa) responsables de la elongación de los ácidos grasos de cadena muy larga que constituyen las ceras (Millar *et al.*, 1999; Todd *et al.*, 1999; Yephremov *et al.*, 1999; Fiebig *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2005; Bach *et al.*, 2008; Beaudoin *et al.*, 2009).

Hay varios genes que se han postulado como responsables de la polimerización de los monómeros de cutina para formar el poliéster (Domínguez *et al.*, 2015a). En este sentido se han descrito varias acil transferasas citoplasmáticas implicadas en la oligomerización de monómeros de cutina (Croteau y Kolattukudy, 1974; Panikashvili *et al.*, 2009) e incluso se ha postulado su participación en la esterificación entre monómeros de cutina y ácidos fenólicos (Molina y Kosma, 2015). Adicionalmente, el estudio de genes específicos de epidermis que se expresan en estadios iniciales del desarrollo ha permitido identificar en distintas especies varios miembros de la familia de lipasas GDSL que podrían estar involucrados en la síntesis de la cutina (Reina *et al.*, 2007; Mintz-Oron *et al.*, 2008; Matas *et al.*, 2010; Yeats *et al.*, 2010). La caracterización de uno de estos genes en tomate ha demostrado su papel en la acumulación de cutina (Girard *et al.*, 2012; Yeats *et al.*, 2012) así como su posible actividad enzimática de polimerización de monómeros de cutina (Yeats *et al.*, 2012). Más recientemente se ha sugerido que *BODYGUARD* (*BDG*), que codifica para una  $\alpha/\beta$  hidrolasa que se acumula en la epidermis de la hoja de *A. thaliana* (Kurdyukov *et al.*, 2006) podría intervenir también en la polimerización de la cutina (Jakobson *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha propuesto que la síntesis de cutina en sus estadios iniciales ocurre mediante autoensamblaje y autopolimerización de los monómeros de cutina (Heredía-Guerrero *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2010) y que el control enzimático ocurriría en estadios más avanzados del desarrollo (Domínguez *et al.*, 2015a).

Son numerosos los factores de transcripción que se han descrito como involucrados en la síntesis de cutícula. Muchos de ellos se han identificado a partir del estudio de mutantes de *A. thaliana* y más recientemente de tomate. Cabe distinguir varias familias de factores de transcripción que participan en la regulación de la cutícula como *MYB*, HD-Zip-IV, MADS-box y *AP2/EREBP*, entre otras (Hen-Avivi *et al.*, 2014; Borisjuk *et al.*, 2014).

Los factores de transcripción de tipo MYB están implicados en una gran variedad de procesos biológicos en plantas, jugando un papel importante en la regulación de rutas metabólicas y del desarrollo (Lippold *et al.*, 2009). En tomate, MYB12 regula la acumulación de flavonoides en la cutícula además de la cantidad de cutícula y ceras (Adato *et al.*, 2009; Ballester *et al.*, 2010). Por otro lado, MYB5b regula la acumulación de ceras cuticulares en uva (Mahjoub *et al.*, 2009). En *A. thaliana* se han identificado varios genes *MYB* entre los que cabe señalar *MYB30*, cuyo producto regula la síntesis de ácidos grasos de cadena muy larga (Raffaele *et al.*, 2008) y por otro lado MYB41, MYB106 y MYB16 involucrados en la regulación del desarrollo y acumulación de cutícula (Cominelli *et al.*, 2008; Oshima *et al.*, 2013).

En los últimos años se ha observado que la clase IV de los factores de transcripción HD-Zip juega un papel importante en el desarrollo de la epidermis, incluyendo la cutícula. Entre ellos cabe destacar *OUTER CELL LAYER 1 (OCL1)* de maíz (Javelle *et al.*, 2010b; Depège-Fargeix *et al.*, 2011), *CUTIN DEFICIENT 2 (CD2/pe)* de tomate (Isaacson *et al.*, 2009; Nadakuduti *et al.*, 2012) y *HOMEODOMAIN GLABROUS 1 (HDG1)* de *A. thaliana* (Wu *et al.*, 2011) los cuales regulan por un lado diversas características del desarrollo de la epidermis y además la cantidad y propiedades de la cutícula.

*FRUITFULL1/TDR4 (FUL1)*, *FRUITFULL2/MBP7 (FUL2)* y *ARLEQUIN/TOMATO AGAMOUS LIKE1 (TAGL1)* son factores de transcripción tipo MADS involucrados en la maduración del fruto y el desarrollo floral que también influyen en la formación de la cutícula afectando a varios parámetros como la cantidad de cutícula y sus componentes, el grosor y las propiedades biomecánicas de la misma (Bemer *et al.*, 2012; Giménez *et al.*, 2015).

Los factores de transcripción AP2/EREBP es una de las familias más amplias en plantas y se caracteriza por regular diversos procesos entre los que se incluyen el desarrollo y diferenciación de la epidermis (Licausi *et al.*, 2013). Dentro de esta familia destacan varios genes asociados con la síntesis de ceras como es el caso de *GLOSSY15* de maíz (Evans *et al.*, 1994), *DECREASE WAX BIOSYNTHESIS* en *A. thaliana* (Go *et al.*, 2014) y *WAX PRODUCTION1* en *Medicago truncatula* Gaertn. (Zhang *et al.*, 2005). Otros miembros como *SHINE1 (SHN1/WIN1)* de *A. thaliana* y uno de sus ortólogos

en tomate *SHN3* están también involucrados en la síntesis de cutina (Aharoni *et al.*, 2004; Kannangara *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2013).

Los trabajos presentados anteriormente refuerzan la idea de una relación íntima, que necesitaría un estudio en profundidad, entre el desarrollo de determinados órganos, la diferenciación y características de la epidermis y la formación de la cutícula.

### *Principales propiedades biofísicas*

La cutícula posee una serie de propiedades biofísicas emergentes, consecuencia de su composición y de la disposición de sus componentes, que le confieren una serie de propiedades de gran relevancia fisiológica que además están fuertemente interrelacionadas (Domínguez *et al.*, 2011a) entre las que cabe destacar las propiedades térmicas, hídricas y mecánicas.

### Propiedades térmicas

La temperatura puede afectar de manera significativa al comportamiento de los polímeros induciendo cambios estructurales en la matriz de los mismos (Nicholson, 1997). A pesar de su importancia para el desarrollo de una planta en distintos ambientes hay pocos trabajos que se hayan centrado en las propiedades térmicas de la cutícula.

La cutina tiene una elevada capacidad calorífica -Cp- (Casado y Heredia, 2001) superior a la de la celulosa, principal componente de los polisacáridos de la cutícula (Boraston, 2005) lo cual sugiere que la cutina tiene una importante función termorreguladora en la planta.

Schreiber y Schönherr (1990) estudiaron el papel de la temperatura en las cutículas aisladas de frutos y hojas procedentes de distintas especies y observaron un incremento volumétrico de las mismas asociado al aumento de la temperatura. Este aumento fue mayor en el caso de las cutinas aisladas sugiriendo que los polisacáridos podrían intervenir limitando la capacidad de expansión de la cutina *per se*.

Las cutículas de distintas especies presentan temperaturas de transición dentro de un rango de temperaturas fisiológico (Schönherr *et al.*, 1979; Eckl

y Gruler, 1980; Schreiber y Schöhherr, 1990; Matas *et al.*, 2004b). Un estudio calorimétrico de la cutícula y cutina a lo largo del desarrollo fue llevado a cabo usando el fruto de tomate como modelo (Matas *et al.*, 2004b). Este trabajo permitió identificar una temperatura de transición vítrea en la cutina alrededor de 23°C, que se reflejó también en la cutícula y no viéndose alterada por el crecimiento del fruto, aunque sí desapareció durante la maduración. Esta desaparición podría estar asociada a cambios estructurales en la cutícula asociados a la maduración, entre los que cabría indicar una posible reestructuración de la cutina asociada a la incorporación de los flavonoides (Matas *et al.*, 2004b). La existencia de temperaturas de transición vítrea es característica de los polímeros amorfos y marca un cambio entre dos estados físicos, uno rígido y otro viscoso. El hecho de que la cutícula presente una temperatura de transición vítrea a temperatura ambiente tiene unas implicaciones fisiológicas claras ya que por encima de esta temperatura habrá una mayor fluidez de las cadenas macromoleculares del polímero, lo cual podría afectar al transporte de sustancias a través de la misma, así como a su resistencia a la deformación y la rotura (Domínguez *et al.*, 2011a).

### Propiedades hídricas

Las propiedades hídricas de la cutícula son de gran importancia para el estudio de la aplicación foliar de nutrientes y pesticidas, la entrada de diversos contaminantes a la planta y la pérdida de agua desde el interior de la planta (Kerstiens, 2006; Fernández y Eichert, 2009). En general, la cutícula presenta una baja permeabilidad al agua, unas mil veces inferior a la de la pared celular (Kerstiens, 2006; Schreiber y Schöhherr, 2009), constituyendo las ceras, principalmente las intracuticulares, la principal barrera a la pérdida de agua (Schöhherr y Lenzian, 1981). Sin embargo, no existe ninguna correlación entre la permeabilidad y la cantidad de ceras (Riederer y Schreiber, 2001) pero sí entre la permeabilidad y la composición química de las ceras, concretamente con la cantidad de compuestos alifáticos de cadena muy larga (Vogg *et al.*, 2004). Recientemente, Jetter y Riederer (2016) estudiaron la permeabilidad de las cutículas de diversas especies y su relación con la composición de las ceras concluyendo que las ceras epicuticulares pueden jugar un papel significativo como barrera frente a la pérdida de agua en aquellas especies en las que las ceras intracuticulares son ricas en compuestos alicíclicos.

Hay estudios que parecen indicar que en la cutícula del fruto de tomate existe una correlación negativa entre la acumulación de flavonoides y de ceras (Heredia *et al.*, 2015). En este sentido, las cutículas de plantas que tenían silenciada la ruta de flavonoides o acumulaban antocianos mostraron una mayor cantidad de ceras y una menor permeabilidad al agua que sus controles (España *et al.*, 2014b). Estos resultados sugieren que la acumulación de determinados flavonoides a nivel celular tiene un impacto en la deposición de ceras y la permeabilidad de la cutícula.

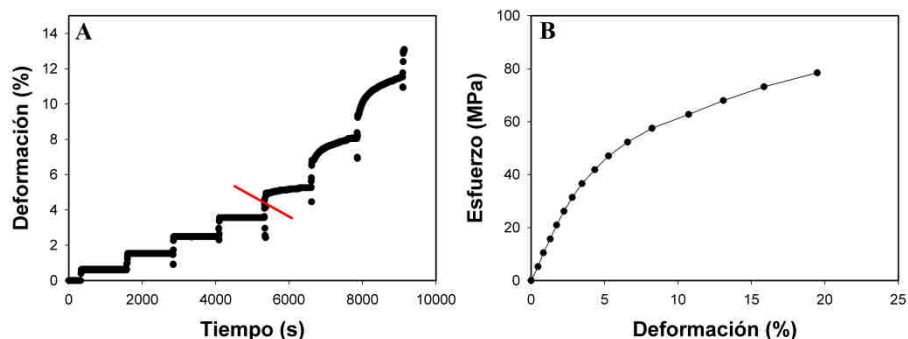
La cutícula es capaz de sorber agua entre un 1 y un 8% de su peso seco (Chamel *et al.*, 1991; Luque *et al.*, 1995a; Domínguez y Heredia, 1999; Reina *et al.*, 2001). Los estudios de sorción sugieren la formación de *clusters* de agua libre en el interior de la cutícula a humedades relativas superiores al 60% (Luque *et al.*, 1995b). La formación de dichas agrupaciones de agua libre afectaría al transporte de moléculas a través de la cutícula haciéndolo más tortuoso (Luque *et al.*, 1995b). Adicionalmente, se ha estudiado la contribución de cada uno de los componentes de la cutícula a su capacidad de sorción de agua. En este sentido se observó que, si bien la eliminación de ceras tiene un efecto dramático en la permeabilidad de la cutícula, no es el caso para su capacidad de sorción, la cual no se ve apenas modificada (Chamel *et al.*, 1991). Por otro lado, la matriz de cutina mostró una capacidad muy baja, siendo los polisacáridos los principales responsables de sorber agua en la cutícula (Chamel *et al.*, 1991; Domínguez y Heredia, 1999; Reina *et al.*, 2001). Igualmente, el dominio de lignina presente en la cutícula de algunas gimnospermas también mostró una elevada capacidad de sorción de agua (Reina *et al.*, 2001).

### Propiedades biomecánicas

La cutícula, al igual que la mayoría de los polímeros vegetales, tiene un comportamiento biomecánico bifásico, con una fase puramente elástica a esfuerzos bajos y una viscoelástica o plástica a esfuerzos superiores (Niklas, 1992; Petracek y Bukovac, 1995; Wiedemann y Neinhuis, 1998; Edelman *et al.*, 2005; Bargel *et al.*, 2006; Domínguez *et al.*, 2011b). El diagrama de fluencia de la Figura I-5A muestra el diferente comportamiento mecánico asociado a las fases elástica y viscoelástica (separadas por una barra roja) en una cutícula de fruto de tomate. El comportamiento elástico se caracteriza por una deformación instantánea que se recupera completamente al eliminar el



esfuerzo, mientras que en el viscoelástico hay una deformación que es dependiente del tiempo y además irreversible (Niklas, 1992). La Figura I-5B muestra un ejemplo de diagrama esfuerzo-deformación donde se pueden diferenciar también las dos fases con sus diferentes pendientes.



**Figura I-5.** A, diagrama de fluencia de la cutícula de fruto de tomate. La línea roja muestra la transición entre la fase elástica inferior y la viscoelástica superior. B, diagrama esfuerzo-deformación de la cutícula de fruto de tomate. Figuras tomadas de Domínguez *et al.* (2015b).

Las propiedades mecánicas de la cutícula se ven modificadas durante el desarrollo de los órganos. Así, en las cutículas de fruto de tomate y cereza al igual que en las de hoja de *Sonneratia alba* Griff., se observó que la cutícula es muy deformable en los estadios jóvenes del desarrollo, posiblemente para facilitar la expansión celular, mientras que en hojas completamente expandidas y en frutos durante la maduración aumenta la rigidez de la cutícula (Knoche *et al.*, 2004; Tsubaki *et al.*, 2012; España *et al.*, 2014a).

El estudio de la contribución de cada uno de los componentes de la cutícula al comportamiento biomecánico de la misma ha permitido discernir que la cutina es la principal responsable del comportamiento viscoelástico mientras que el resto de los componentes contribuyen a la rigidez de la misma (Domínguez *et al.*, 2011b). Por un lado, la cutina se caracteriza por ser fácilmente deformable y presentar un esfuerzo de fractura bajo mientras que los polisacáridos contribuyen de modo significativo a la fase elástica aumentando la rigidez y el esfuerzo de fractura y disminuyendo al mismo tiempo la capacidad de deformación (López-Casado *et al.*, 2007). Por su parte, el incremento en la rigidez y, dependiendo de la especie, del esfuerzo de fractura, debido a ceras se ha asociado principalmente las ceras intracuticulares (Petracek y Bukovac, 1995; Takahashi *et al.*, 2012; Khanal *et*

*al.*, 2013; Tsubaki *et al.*, 2013). Finalmente, el papel de los flavonoides ha sido estudiado sólo en el fruto de tomate empleando distintas estrategias, desde el estudio de mutantes de maduración y de acumulación de compuestos fenólicos hasta el silenciamiento de alguno de los genes involucrados en la síntesis de flavonoides (Bargel y Neinhuis, 2004; Domínguez *et al.*, 2009; Adato *et al.*, 2009; España *et al.*, 2014b). Así se ha podido demostrar que son los flavonoides, y no otros procesos asociados a la maduración o a las mutaciones estudiadas, los que contribuyen a la longitud de la fase elástica, el aumento de la rigidez y del esfuerzo de fractura y la disminución de la deformación de la cutícula (España *et al.*, 2014b). Los flavonoides tienen un efecto mucho más significativo sobre las propiedades biomecánicas que los polisacáridos, a pesar de ser éstos mucho más abundantes, o que las ceras (López-Casado *et al.*, 2007; Khanal *et al.*, 2013; España *et al.*, 2014b).

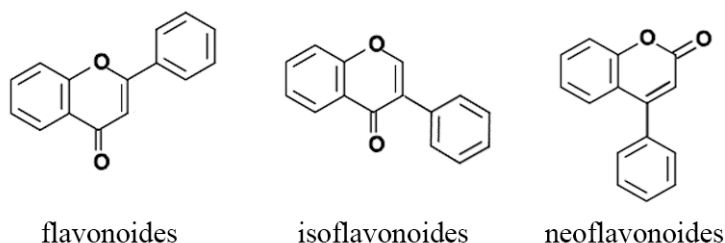
Las condiciones ambientales afectan de modo significativo al comportamiento mecánico de la cutícula (Domínguez *et al.*, 2011a,b). En consecuencia, se ha podido observar que la hidratación y el aumento de la temperatura tienen un efecto similar sobre las propiedades mecánicas, disminuyendo la rigidez y el esfuerzo de fractura y aumentando la deformación (Petracek y Bukovac, 1995; Edelmann *et al.*, 2005; Matas *et al.*, 2005; López-Casado *et al.*, 2007; Domínguez *et al.*, 2009). Este efecto plastificador que tiene el agua y la temperatura se debe a un aumento de la movilidad de las cadenas metilénicas,  $(CH_2)_n$ , y de otros grupos funcionales minoritarios, indicando una disminución en la resistencia potencial del polímero a la deformación (Stark *et al.*, 2008).

## Flavonoides

### *Clasificación y estructura*

El término flavonoide hace referencia a una amplia colección de compuestos naturales que tienen un esqueleto  $C_6-C_3-C_6$  o más específicamente una función fenilbenzopirano (Marais *et al.*, 2006). Según la posición de la unión del anillo aromático al grupo benzopirano se diferencian tres clases: flavonoides en sentido estricto (2-fenil 1,4-benzopiranos), isoflavonoides (3-fenil 1,4-benzopiranos) y neoflavonoides (4-fenil 1,2-benzopiranos) (Figura I-6). Los flavonoides e isoflavonoides se subdividen

en varios tipos según el grado de oxidación y saturación del anillo heterocíclico o la presencia de anillos adicionales. Así, dentro de los flavonoides se distinguen flavanos, flavanonas, flavonas, flavonoles, dihidroflavonoles, flavanoles, entre otros. Los isoflavonoides se subdividen en isoflavanos, isoflavonas, isoflavanonas, isoflavonoles, pterocarpanos, rotenoides, etc. Finalmente se puede distinguir un pequeño grupo de flavonoides minoritarios formado por las auronas y chalconas.



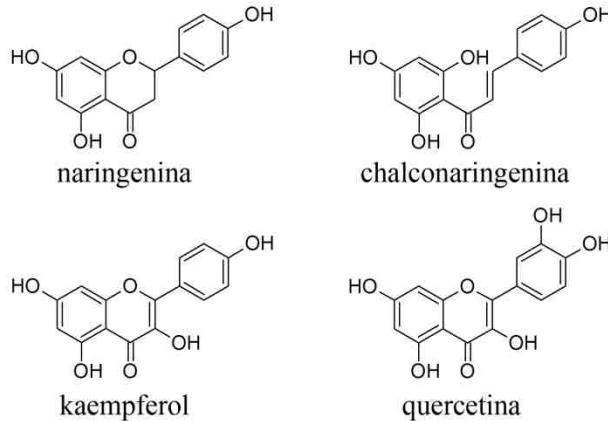
**Figura I-6.** Clasificación de los flavonoides según su esqueleto de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC (<https://iupac.org/>).

Los flavonoides son compuestos del metabolismo secundario de las plantas que proceden de la ruta metabólica de los fenilpropanoides. Son el grupo de metabolitos secundarios más amplio y con mayor distribución en el reino vegetal. Se han descrito más de 10.000 flavonoides (Mouradov y Spangenberg, 2014) siendo esta gran diversidad atribuible a la combinación de la amplia variabilidad de tipos de flavonoides con modificaciones adicionales de la aglicona, estructura base de los flavonoides, tales como la glicosilación, la metilación y la acilación. Los flavonoides están presentes en musgos, helechos, gimnospermas, angiospermas y en varios grupos de algas (Wink *et al.*, 2010; Freile-Peigrín y Robledo, 2014; Goiris *et al.*, 2014).

### *Localización y funciones*

Los flavonoides se pueden encontrar en los frutos, hojas, raíces y varios órganos de la flor como pétalos, estigma, estilo y polen. La concentración de los mismos en cada tejido varía con el desarrollo y las condiciones ambientales. En el fruto de tomate, los flavonoides se acumulan en la piel y la placenta (Slimestad y Verheul, 2005a) mientras que, en el mesocarpo, que comprende más del 95% del peso total del fruto, sólo se encuentran cantidades traza (Bovy *et al.*, 2007). La mayor acumulación de flavonoides se da durante la maduración, localizándose >98% en la piel (Meléndez-Martínez

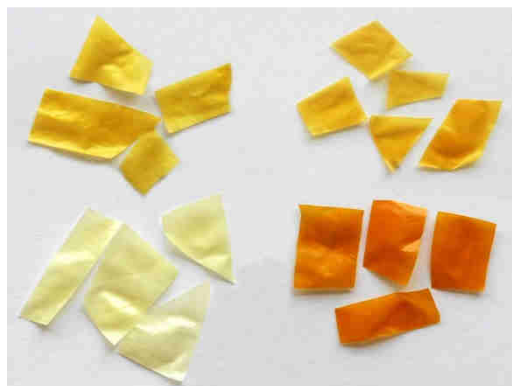
*et al.*, 2010). Aunque se han identificado más de 70 flavonoides diferentes en el fruto de tomate, fundamentalmente distintas formas conjugadas (Moco *et al.*, 2006; Ijima *et al.*, 2008), sólo tres o cuatro compuestos están presentes en cantidades importantes en el fruto maduro (Slimestad y Verheul, 2009). La Figura I-7 muestra los principales flavonoides presentes en el fruto de tomate maduro.



**Figura I-7.** Principales flavonoides presentes en el fruto de tomate. La naringenina y chalconaringenina se acumulan principalmente como agliconas mientras que el kaempferol y la quercetina están presentes en sus formas glicosiladas, concretamente kaempferol 3-rutinosido y quercetina 3-rutinosido (rutina) (Slimestad y Verheul, 2009).

En cuanto a la localización subcelular de los flavonoides, ésta es muy amplia e incluye el citosol, retículo endoplásmico, membranas, vacuola, cloroplasto, núcleo, vesículas, células especializadas como glándulas, tricomas y laticíferos, canales resiníferos, apoplasto, pared celular y cutícula (Zhao y Dixon, 2010). Los compuestos más hidrofílicos se almacenan en la vacuola, apoplasto, pared celular y laticíferos mientras que los lipofílicos lo hacen en la cutícula, laticíferos, glándulas, membranas y canales resiníferos (Wink, 2010). Los flavonoides que se acumulan en la superficie de las plantas, incluyendo la cutícula y células especializadas como los tricomas glandulares, son principalmente agliconas y se sugiere que su principal función es la protección frente a herbívoros y microorganismos así como frente a la radiación ultravioleta (Onyilagha y Grotewold, 2004). Un caso especial es el fruto de tomate donde la acumulación de chalconaringenina, de color amarillo-anaranjado, en la cutícula (Figura I-8) contribuye al color de

los frutos maduros y a su resistencia mecánica (Baker *et al.*, 1982; España *et al.*, 2014a,b).



**Figura I-8.** Fragmentos de cutículas aisladas procedentes de frutos de tomate maduros de distintos genotipos. Las diferencias en color se deben a la distinta acumulación del flavonoide chalconaringenina. Fotografía Dra. E. Domínguez.

Los flavonoides se pueden sintetizar en los mismos tejidos en los que se acumulan o actúan o bien pueden ser traslocados (Zhao y Dixon, 2010). Se desconoce en gran medida el transporte subcelular de flavonoides si bien se han identificado algunos mecanismos de transporte (Zhao, 2015). Entre ellos destaca la participación de transportadores de membrana tipo ABC y MATE, el transporte mediado por glutatión-S-transferasas o el tráfico de vesículas (Yazaki, 2006; Conn *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2011; Ichino *et al.*, 2014). Si bien se desconoce el mecanismo de transporte de los flavonoides a la cutícula, se han identificado varios transportadores de membrana que, posiblemente en combinación con vesículas, participan en la secreción de flavonoides al apoplasto (Banasiak *et al.*, 2013; Zhao, 2015).

La diversidad en la química, el tamaño molecular, la estructura tridimensional y las propiedades físicas y bioquímicas de los flavonoides les permiten interactuar en diferentes localizaciones subcelulares y tener una considerable actividad biológica en plantas, animales y microbios. No obstante, se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales los flavonoides actúan como señales y cuáles son exactamente sus dianas (Buer *et al.*, 2010). Algunas de las posibles dianas que se han postulado o demostrado *in vivo* incluyen factores de transcripción, kinasas,

aminopeptidasas, proteínas de membrana, histonas, transportadores ABC, hidrolasas, etc. (Peer y Murphy, 2006).

Los flavonoides ejercen numerosas funciones en las plantas. Por un lado, funcionan como pigmentos que dan color a hojas, flores y frutos haciéndolos atractivos a determinados insectos para asegurar la polinización al igual que la dispersión de las semillas mediante zoocoria (Winkel-Shirley, 2001). Los flavonoides también protegen las plantas absorbiendo la mayor parte de la radiación ultravioleta gracias a su localización en las capas más superficiales de la planta, incluyendo la cutícula (Tattini *et al.*, 2005; Pfündel *et al.*, 2006; Agati *et al.*, 2013). Funcionan como antioxidantes contribuyendo a la reducción de especies reactivas de oxígeno (Agati *et al.*, 2013). Adicionalmente actúan como defensa frente a bacterias, hongos patógenos y herbívoros (Kliebenstein, 2004; Bidart-Bouzat y Kliebenstein, 2008). También participan en la señalización entre el suelo y la rizosfera (Hassan y Mathesius, 2012). Igualmente protegen a las plantas frente a estreses abióticos como el exceso de radiación lumínica, sequía, frío o falta de nutrientes (Winkel-Shirley, 2002; Tattini *et al.*, 2004; Hannah *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2008). Los flavonoides intervienen en la viabilidad y germinación del polen y en el crecimiento del tubo polínico en el estilo (Mo *et al.*, 1992; van der Meer *et al.*, 1992). En fruto de tomate se ha observado que el silenciamiento del gen *CHS* conduce a la partenocarpia (Schijlen *et al.*, 2007). Otro papel que parecen jugar es el de reguladores del desarrollo al involucrarse en el transporte polar de auxinas (Brown *et al.*, 2001; Peer y Murphy, 2007) afectando la arquitectura de la planta y el tamaño de los órganos (Besseau *et al.*, 2007; Laffont *et al.*, 2010; Maloney *et al.*, 2014). Recientemente se ha puesto de manifiesto que los flavonoides pueden además modificar el tamaño y forma celular, posiblemente a través de la regulación de las auxinas (Ringli *et al.*, 2008; Laffont *et al.*, 2010; España *et al.*, 2014b).

Los flavonoides juegan un papel importante en la dieta de los animales donde ejercen un amplio rango de actividades biológicas principalmente asociadas a sus propiedades antioxidantes y su habilidad para modular enzimas y receptores celulares (Jaganath y Crozier, 2010). El papel de los flavonoides como nutraceuticos es complejo debido a que frecuentemente muestran efectos pleiotrópicos a lo que hay que sumar la biodisponibilidad de los mismos y los cambios químicos asociados al metabolismo presistémico que frecuentemente sufren los flavonoides y que afectan a su bioactividad

(Jaganath y Crozier, 2010). Se ha descrito que los flavonoides pueden tener propiedades antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias, analgésicas, antitrombóticas, antioxidantes, anticancerosas, citostáticas, etc. (Graf *et al.*, 2005). Sin embargo, algunos flavonoides tienen efectos mutagénicos y prooxidantes, pueden interferir con rutas bioquímicas esenciales y con la administración oral de medicamentos, unirse covalentemente al ADN e inhibir la absorción de hierro (Chan *et al.*, 1999; Hodek *et al.*, 2002; Walle *et al.*, 2003; Petry, 2014).

### *Genes involucrados en su síntesis y regulación*

La biosíntesis de los flavonoides se enmarca dentro de la ruta de los fenilpropanoides. Al ser una familia de compuestos tan amplia, su ruta biosintética es compleja estando implicados un gran número de compuestos y genes tanto estructurales como reguladores. La Figura I-9 muestra un esquema resumido de la síntesis de flavonoides con las principales enzimas involucradas.

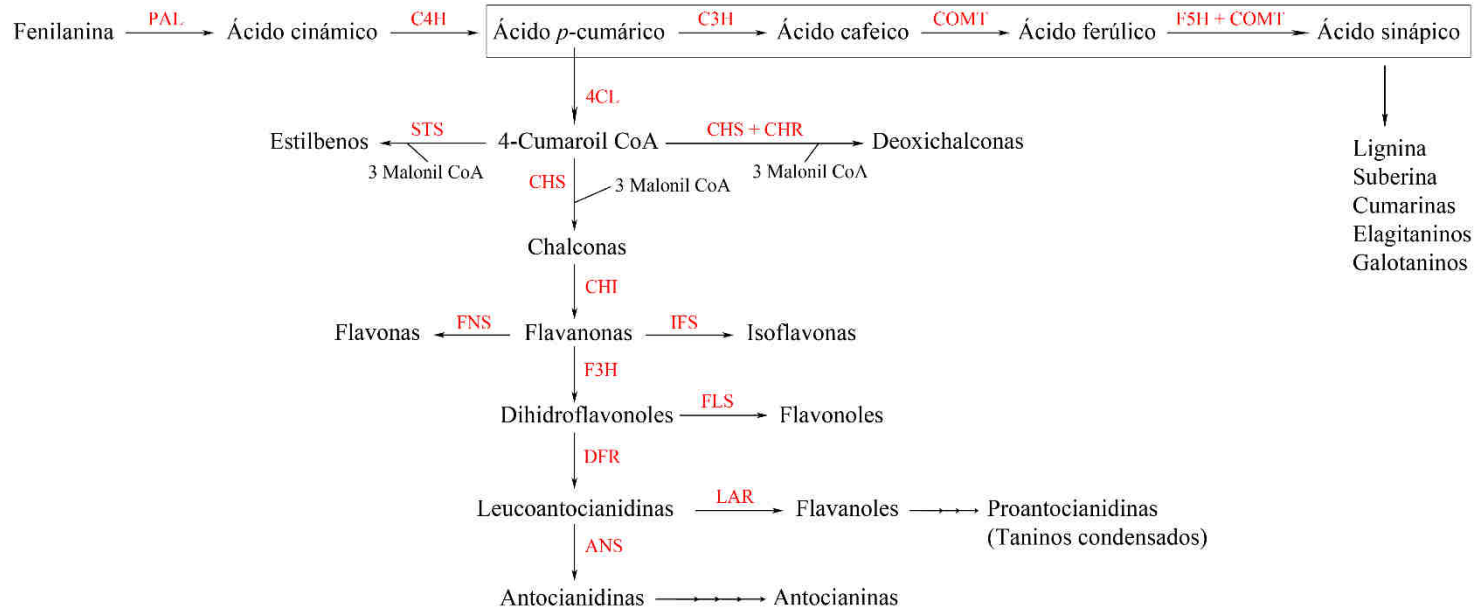
La FENILALANINA AMONIO LIASA (PAL) es la primera enzima en la ruta de los fenilpropanoides conectando el metabolismo primario con el metabolismo secundario. La PAL cataliza la desaminación de la fenilalanina, convirtiéndola en ácido trans-cinámico, precursor de todos los derivados fenólicos, incluyendo la lignina, los hidroxicinamatos, cumarinas, taninos, flavonoides y antocianinas (Brödenfeldt y Mohr, 1988) (Figura I-9). En todas las plantas estudiadas la PAL está codificada por una familia multigénica que, dependiendo de la especie, está formada por un número pequeño de genes, como es el caso de la frambuesa o la judía (Cramer *et al.*, 1989; Kumar y Ellis, 2001) o por más de 12, como ocurre en la patata o el tomate (Joos y Hahlbrock, 1992; Chang *et al.*, 2008).

Los enzimas responsables de la síntesis de la mayoría de los flavonoides están codificados en la mayoría de las especies estudiadas por familias génicas como en el caso de petunia (Koes *et al.*, 1989a), guisante (Ito *et al.*, 1997) o *Ipomoea purpurea* (L.) Roth (Durbin *et al.*, 2000), mientras que en otras como *A. thaliana* están codificados por genes únicos (Winkel-Shirley, 1999). En el caso del tomate, todos los genes responsables de la síntesis de los flavonoides identificados en fruto (ver Figura I-7) están representados por familias génicas (<https://solgenomics.net/>). Tal es el caso de las

CHALCONA SINTASAS (CHS), CHALCONA ISOMERASAS (CHI), FLAVANONA 3-HIDROXILASAS (F3H) y FLAVONOL SINTASAS (FLS).

La CHS es la primera enzima de la ruta de los flavonoides. Pertenece a la superfamilia de poliquétidos sintasa tipo III caracterizada por llevar a cabo un número variable de condensaciones iterativas partiendo de diversas moléculas (Austin y Noel, 2003). Esta enzima cataliza la adición secuencial descarboxilativa de tres unidades de acetato procedentes del malonil-CoA a una molécula de cumaroil-CoA, seguida de una ciclación intramolecular y aromatización para formar el flavonoide chalconaringenina. CHS es la enzima clave en la síntesis de flavonoides ya que actúa como un cuello de botella controlando su síntesis y acumulación (Figura I-9). La CHI es la siguiente enzima de la ruta de biosíntesis de flavonoides, cataliza la ciclación intramolecular de chalcona en su correspondiente flavanona, la naringenina. Esta reacción de isomerización también puede darse por cambios en las condiciones de temperatura y pH, favoreciendo ambos la isomerización de la naringenina entre su forma chalcona (de color amarillo anaranjado) y flavanona (color crema) (Domínguez *et al.*, 2015b). La hidroxilación de la posición C<sub>3</sub> del anillo heterocíclico de la flavanona y su conversión a dihidroflavonol es catalizada por la enzima F3H. Se trata de una enzima miembro de la familia dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato/Fe(II) (Britsch y Grisebach, 1986). La enzima FLS es también miembro de la familia dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato/Fe(II) y cataliza la formación de un doble enlace en el anillo heterocíclico del dihidroflavonol que pasa a flavonol (Pelletier *et al.*, 1997).





**Figura I-9.** Esquema de la ruta de biosíntesis de flavonoides. En rojo se destacan las principales enzimas involucradas. PAL: fenilalanina amonio liasa; C4H: cinamato 4-hidroxilasa; C3H: cumarato 3-hidroxilasa; COMT: cafeato/5 hidroxiferulato O-metil transferasa; F5H: ferulato 5-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato:coenzima A ligasa; STS: estilbeno sintasa; CHS: chalcona sintasa; CHR: chalcona reductasa; CHI: chalcona isomerasa; FNS: flavona sintasa; F3H: flavanona 3-hidroxilasa; FLS: flavonol sintasa; IFS: isoflavona sintasa; DFR: dihidroflavonol reductasa; LAR: leucoantocianidina reductasa; ANS: antocianidina sintasa. Adaptado de Domínguez *et al.* (2015b).

Son pocos los trabajos que en fruto de tomate han estudiado la expresión durante el desarrollo de algún miembro de las familias génicas *CHS*, *CHI*, *F3H* y *FLS*. En este sentido, se ha descrito un aumento muy significativo de la expresión de los genes *CHS1* (Solyc09g091510) y *CHS2* (Solyc05g053550) durante la maduración seguido de una disminución en estadio maduro (Ballester *et al.*, 2010; España *et al.*, 2014b). Un comportamiento similar se detectó en los genes *F3H* (Solyc02g083860) y *F3H/FLS* (Solyc11g013110) (Ballester *et al.*, 2010). Por el contrario, el nivel de expresión de *CHI* disminuyó durante la maduración en un caso (Solyc05g010320) pero aumentó ligeramente en otro (Solyc05g052240) (Bovy *et al.*, 2002; Ballester *et al.*, 2010). Basándose en estos resultados, Ballester *et al.* (2010) propusieron que la acumulación de chalconaringenina en fruto de tomate se debía a esta baja expresión de *CHI* durante la maduración que actúa como paso limitante en la acumulación de flavonoides. La sobreexpresión de un gen *CHI* de petunia en tomate conllevó la acumulación masiva de flavonoles en frutos maduros (Muir *et al.*, 2001), apoyando la idea de que la *CHI* es la enzima limitante de la acumulación de flavonoides en fruto de tomate.

La acumulación de flavonoides está regulada por diversas condiciones ambientales (Mierziak *et al.*, 2014). La luz, sobre todo la luz UV, es uno de los parámetros ambientales más importantes que afectan el perfil cualitativo y cuantitativo de los flavonoides acumulados (Zoratti *et al.*, 2014). Se ha observado un aumento de la expresión PAL, CHS y CHI en respuesta a la luz (Smith y Attridge, 1970; van Tunen *et al.*, 1988; Løvdaal *et al.*, 2010) así como un incremento en la cantidad de flavonoides en respuesta a una mayor intensidad lumínica (Smith y Harper, 1970; Lavola, 1998; Tattini *et al.*, 2004; Azuma *et al.*, 2012; Koyama *et al.*, 2012; Martínez-Lüscher *et al.*, 2014). El estudio de la región promotora del gen *CHS* en diversas especies ha permitido la identificación de elementos inducibles por luz (Schulze-Lefert *et al.*, 1989a,b; van der Meer *et al.*, 1990; Merkle *et al.*, 1994). Asimismo, en tomate se ha identificado *DE-ETIOLATED 1 (DET1)*, uno de los genes que regula diversas rutas de señalización controladas por la luz entre las que se incluye los flavonoides y carotenoides (Davuluri *et al.*, 2005).

La temperatura y la sequía también afectan a la acumulación de flavonoides, habiéndose observado una mayor cantidad de flavonoides en respuesta a la aclimatación al frío y a la sequía (Olsen *et al.*, 2009; Tattini *et*

*al.*, 2004; Lillo *et al.*, 2008; Azuma *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha demostrado un aumento de las actividades PAL, CHS y CHI en presencia de patógenos (Dixon *et al.*, 1983; Cramer *et al.*, 1985) así como cambios en la expresión de varios genes de la ruta (Mizuno *et al.*, 2014) y una mayor acumulación de flavonoides (Jasiński *et al.*, 2009).

El crecimiento de las plantas en condiciones limitantes de nutrientes minerales también tiene un efecto significativo en la acumulación de flavonoides. Se ha demostrado que la limitación de nitrógeno y fósforo causa un aumento en la concentración de flavonoides (Stewart *et al.*, 2001; Scheible *et al.*, 2004; Misson *et al.*, 2005; Lea *et al.*, 2007; Morcuende *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2008; Lillo *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2009; Løvdaal *et al.*, 2010). Este aumento estuvo acompañado por una mayor expresión de varios genes de la ruta de los flavonoides entre los que cabe destacar *CHS*, *CHI*, *F3H*, *FLS* y genes más específicos de la síntesis de antocianos y proantocianidinas (Bongue-Bartelsman y Phillips, 1995; Lillo *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2008; Løvdaal *et al.*, 2010; Soubeyrand *et al.*, 2014). Adicionalmente, se ha observado un aumento de la expresión *PAL* en condiciones limitantes de nitrógeno y fósforo así como de genes relacionados con la síntesis de lignina (Lillo *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2008; Soubeyrand *et al.*, 2014). La mayoría de estos trabajos se han realizado a nivel de hoja y sólo en el caso de uva y tomate se ha estudiado también el fruto no encontrándose diferencias en la acumulación de flavonoides en tomate pero sí en uva (Stewart *et al.*, 2001; Soubeyrand *et al.*, 2014).

Se han identificado numerosos factores de transcripción que actúan en la ruta de biosíntesis de flavonoides. Varios de ellos están involucrados en el proceso de maduración del fruto de tomate como es el caso *TAGL1*, *FUL2*, *APETALA2*, *RIPENING INHIBITOR (RIN)* y *NON-RIPENING (NOR)* (Tigchelaar *et al.*, 1978; Giménez *et al.*, 2010; Karlova *et al.*, 2011; Bemer *et al.*, 2012). Estos dos últimos se caracterizan porque los frutos con las mutaciones *nor* y *rin* no llegan a madurar completamente, adquiriendo tan sólo un color amarillo-anaranjado tras varios meses (Tigchelaar *et al.*, 1978). Se ha podido observar que este cambio de color de los frutos con las mutaciones *nor* y *rin* no está asociado a la acumulación de flavonoides, la cual se ve reprimida en ambos casos tanto a nivel de fruto como de cutícula, caracterizada por carecer de color (Bargel y Neinhuis, 2004; Domínguez *et al.*, 2009; Fujisawa *et al.*, 2012). Otro mutante involucrado en la maduración

del fruto de tomate es *delayed fruit deterioration (dfd)*, caracterizado por presentar una larga vida poscosecha, pero sin efectos obvios en la maduración del fruto más allá de la falta de flavonoides en la cutícula (Saladié *et al.*, 2007).

Los factores de transcripción tipo MYB participan en la regulación de la ruta de biosíntesis de flavonoides, habiéndose identificado varios genes en uva y manzana (Deluc *et al.*, 2006; Ban *et al.*, 2007; Azuma *et al.*, 2008; Czemplin *et al.*, 2009; Vimolmangkang *et al.*, 2013; Koyama *et al.*, 2014; Duan *et al.*, 2016; Pérez-Díaz *et al.*, 2016). En tomate sólo se ha descrito la participación de *ANTHOCYANIN-1 (ANTI)* y *MYB12* en dicha regulación (Mathews *et al.*, 2003; Adato *et al.*, 2009; Ballester *et al.*, 2010). *MYB12* es el gen responsable de la mutación y (*colorless fruit epidermis*) caracterizada por tener una cutícula carente de flavonoides, lo que confiere al fruto un color rosa (Adato *et al.*, 2009; Ballester *et al.*, 2010).

En tomate se han empleado diversas estrategias para modificar tanto el perfil como la cantidad de flavonoides acumulados en el fruto con la intención de potenciar sus propiedades beneficiosas sobre la salud. Entre ellas cabe destacar la expresión heteróloga de genes procedentes de otras especies como *CHI* de petunia o los factores de transcripción *LC* y *CI* de maíz que condujeron a un aumento en la concentración de los flavonoles glicosilados quercetina y kaempferol en los frutos maduros (Muir *et al.*, 2001; Bovy *et al.*, 2002). La expresión de *FLAVONA SINTASA-II* de *Gerbera x hybrida* hort. favoreció la acumulación de la flavona luteolina, así como de quercetina y kaempferol glicosilados (Schijlen *et al.*, 2006). De igual forma, la expresión de *CHALCONA REDUCTASA* de alfalfa permitió la síntesis de deoxichalconas en los tomates maduros (Schijlen *et al.*, 2006) mientras que la expresión de *ESTILBENO SINTASA* de uva llevó a la acumulación de estilbenos (Giovinazzo *et al.*, 2005; Schijlen *et al.*, 2006; Ingrosso *et al.*, 2011). Por otro lado, el silenciamiento de los genes *F3H* o *FLS* aumentó significativamente la cantidad de chalconaringenina en los frutos maduros reduciendo al mismo tiempo la acumulación de flavonoles (Bovy *et al.*, 2007). Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se estudió el efecto de la modificación de la cantidad o el perfil de flavonoides en otras características del fruto o de la planta, a pesar del papel significativo que tienen los flavonoides en diversos procesos del desarrollo.

En este sentido, el efecto de la expresión de *ROSEAI* (*ROSI*) y *DELILA* (*DEL*), dos factores de transcripción procedentes de *Antirrhinum majus* L., durante la maduración del fruto de tomate se ha estudiado a varios niveles encontrándose no sólo una acumulación de antocianos y un aumento de la cantidad de flavonoles (Butelli *et al.*, 2008) sino además una mayor vida poscosecha y menor susceptibilidad a *Botrytis cinerea* de los frutos al igual que una menor permeabilidad de sus cutículas, posiblemente asociada a la mayor cantidad de ceras acumuladas (Zhang *et al.*, 2013; España *et al.*, 2014b).



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# OBJETIVOS

*"La ciencia más útil es aquella cuyo fruto  
es el más comunicable"*  
*Leonardo Da Vinci*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Teniendo en cuenta los antecedentes previamente reseñados y recogidos en la *Introducción general*, los objetivos concretos de la presente tesis doctoral son:

1. Estudiar la expresión de los distintos miembros de las familias génicas *CHS*, *CHI* y *F3H* a lo largo del desarrollo en distintos tejidos de tomate.
2. Estudiar el papel de la modificación de la ruta de los flavonoides sobre la calidad del fruto de tomate, haciendo especial énfasis en la síntesis y propiedades de la cutícula vegetal.
3. Determinar si el nitrógeno, suministrado como nutriente en la solución de riego, influye en la expresión de genes del metabolismo de los flavonoides y analizar la acumulación de estos compuestos en la cutícula del fruto.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# MATERIALES Y MÉTODOS

*"Son vanas y están plagadas de errores las ciencias que no han nacido del experimento, madre de toda certidumbre"*

*Leonardo Da Vinci*





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## Instalaciones

El trabajo recogido en la presente memoria se realizó en las instalaciones de la Estación Experimental «La Mayora» perteneciente al Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM UMA-CSIC) que está situada en el término municipal de Algarrobo-Costa (Málaga).

Las plantas se cultivaron en un invernadero de tipo multitúnel con cubierta de polietileno (Figura M-1). Este invernadero tiene planta rectangular con unas dimensiones de 60 x 40 m y una altura máxima del arco de 6 m y una mínima de 4,5 m. El invernadero está autorizado para el grado primero de confinamiento (NC-1), por lo que es adecuado para el cultivo de plantas transgénicas de tomate. Cuenta con una entrada provista de doble puerta con ventilación hacia el exterior para evitar la entrada de insectos y con aperturas cenitales cubiertas con mallas anti-insectos.



**Figura M-1.** Vista del interior del invernadero de tipo multitúnel donde se cultivaron las plantas.

## Material vegetal

El material vegetal empleado en los estudios llevados a cabo en este trabajo fue *Solanum lycopersicum* ‘Moneymaker’ (en adelante MM). Se trata de un cultivar de tomate de porte generalmente indeterminado y con frutos redondos, lisos, sin hombros, de tamaño mediano y con buena formación en

ramillete. Además, se estudiaron dos líneas transgénicas de MM que tienen modificada la ruta de biosíntesis de flavonoides y que fueron cedidas por el Dr. Arnaud Bovy (Wageningen Agricultural University, Holanda) y cuyas características principales son:

- Plantas que sobreexpresan el gen *CHALCONA ISOMERASA A* (GenBank AF233637; gen *PhCHI*) de *Petunia x hybrida* hort. ex E.Vilm. de forma constitutiva bajo el promotor CaMV 35S duplicado (Muir *et al.*, 2001). En esta memoria a estas plantas se las denominará *CHlox*.
- Plantas que sobreexpresan conjuntamente el gen *CHALCONA ISOMERASA A* de *P. hybrida* y el gen *FLAVONA SINTASA II* (AF156976; gen *GhFNS/CYP93B2*) de *Gerbera x hybrida* hort. (Martens y Forkmann, 1999) de forma constitutiva bajo el promotor CaMV 35S duplicado (Schijlen *et al.*, 2006). A partir de ahora se las denominará *CHI/FNSox*.

### Diseño experimental

El estudio de las plantas *CHlox* y *CHI/FNSox* y su correspondiente control MM se llevó a cabo en las campañas de verano e invierno de 2012. Se cultivaron 18 plantas por genotipo distribuidas en tres bloques de seis plantas cada uno. Los genotipos dentro de cada bloque se distribuyeron al azar.

Los experimentos de abonado con diferentes concentraciones de nitrógeno se llevaron a cabo en la primavera-verano de 2013. Se cultivaron 18 plantas por tratamiento. En este caso las plantas se dispusieron en filas ya que no se podía modificar el riego dentro de una misma fila.

Los cultivos se rodearon con plantas de vera para evitar el efecto borde.

### Semilleros y cultivos

Las semillas se germinaron en placas de Petri con papel de filtro humedecido en una estufa a 25°C y en oscuridad tras un tratamiento previo con una solución de hipoclorito sódico al 4% (p/v) durante media hora y tres lavados posteriores con agua destilada. Una vez germinadas, las semillas se

sembraron en bandejas de polietileno de 54 alvéolos que se rellenaron con una mezcla de sustrato hortícola y fibra de coco con un aporte de vermiculita para mejorar la aireación del sustrato. Las bandejas se regaron cada dos días debido al pequeño volumen del alvéolo y se mantuvieron en un invernadero de vidrio hasta el momento del trasplante. Previo al trasplante se dieron unos tratamientos preventivos contra *Pythium* sp. con Previcur®-N (722 g/L de propamocarb clorhidrato; Bayer CropScience, Alemania) al 0,15% (v/v).

El trasplante se llevó a cabo cuando las plantas tenían dos o tres hojas verdaderas pasándolas a macetas de 16 L rellenas con arena silíceas, a razón de una planta por maceta. Estas se colocaron sobre unas canaletas de obra que permitieron el drenaje de las mismas y la recogida de los lixiviados. El marco de plantación fue de 1 m entre líneas y 0,5 m entre macetas. Las plantas se entutoraron con una rafia atada a la base del tallo, enrollada a lo largo del mismo y asida por arriba a las líneas de alambre, las cuales se encontraban sujetas a la estructura del invernadero a una altura de 2 m. Las plantas se podaron a 2 tallos para disponer de un mayor número de frutos y las flores se vibraron dos veces por semana para facilitar su polinización.

Para prevenir las principales enfermedades que afectan al cultivo de tomate se administraron regularmente dos tratamientos: uno insecticida contra mosca blanca y pulgones y otro fungicida contra oídio. El tratamiento insecticida se aplicó semanalmente y se alternaron dos soluciones diferentes (solución 1: imidacloprid + piriproxifen; solución 2: metomilo + buprofezin). El tratamiento fungicida sólo se aplicó en caso de presencia del hongo y alternaron diferentes materias activas como bupirimato, azoxystrobin, etc.

**Tabla M-1.** Composición de la solución nutritiva Hoagland ½ modificada para el cultivo de tomate.

<b>Macronutrientes</b>	<b>mM</b>	<b>Micronutrientes</b>	<b>µM</b>
KNO <sub>3</sub>	3,30	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	46,10
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50	MnCl <sub>2</sub>	18,90
MgSO <sub>4</sub>	1,02	ZnSO <sub>4</sub>	1,42
CaCl <sub>2</sub>	2,65	CuSO <sub>4</sub>	0,50
HNO <sub>3</sub>	1,00	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,35
		FeNaEDTA	25,80

La solución nutritiva utilizada fue ½ de la solución propuesta por Hoagland y Arnon (1950) modificada para el cultivo de tomate. La

composición de dicha solución se muestra en la Tabla M-1. El riego se realizó mediante un sistema programado de goteo antidrenante con un flujo de 2 L/h, dándose cada media hora un riego de un minuto o minuto y medio de duración en función de la necesidad de las plantas.

Las soluciones nutritivas empleadas para el cultivo con distintas concentraciones de nitrógeno fueron formuladas por el Dr. Vicente Martínez (CEBAS-CSIC, Murcia) para una concentración final de nitrógeno de 3 mM, 6 mM y 12 mM (Tabla M-2). A todas ellas se les añadió la misma cantidad de micronutrientes que en el caso de la Hoagland ½ modificada para el cultivo de tomate (ver Tabla M-1).

**Tabla M-2.** Composición de macronutrientes de las soluciones nutritivas con distintas concentraciones de nitrógeno. La cantidad de micronutrientes añadidos fue la misma para las tres soluciones.

<b>Macronutrientes (mM)</b>	<b>3 mM N</b>	<b>6 mM N</b>	<b>12 mM N</b>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	2,20	2,20
KNO <sub>3</sub>	1,07	-	6,40
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,70	3,24	-
MgSO <sub>4</sub>	1,05	1,05	1,05
CaCl <sub>2</sub>	3,72	1,35	1,35
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00	1,00	1,00
HNO <sub>3</sub>	2,00	2,00	2,00

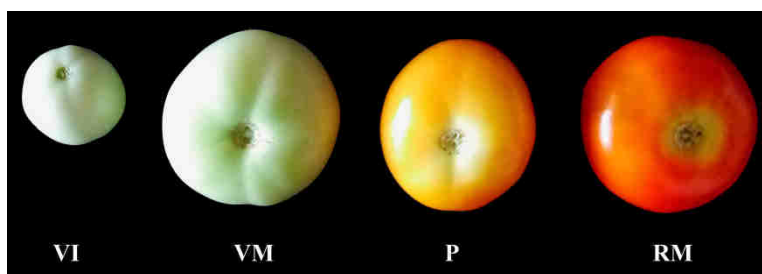
Todas las soluciones nutritivas empleadas en esta memoria se llevaron a un pH final de 5,8.

Para el estudio de la expresión génica en raíz, se cultivaron plantas en medio hidropónico con el fin de obtener un material limpio y evitar daños a la raíz. Para ello, las semillas germinadas se colocaron en tubos tipo Falcon (50 mL) con solución nutritiva Hoagland ½ hasta que desarrollaron dos hojas verdaderas. En este estadio las plantas se pasaron a recipientes de 500 mL con aireación continua que contenían la misma solución nutritiva y donde se cultivaron hasta que desarrollaron cinco hojas verdaderas, momento en el que se muestrearon las raíces. El crecimiento se llevó a cabo en una cámara de cultivo en condiciones de día largo (16 h luz ~25°C – 8 h oscuridad ~18°C).



## Recolección de muestras

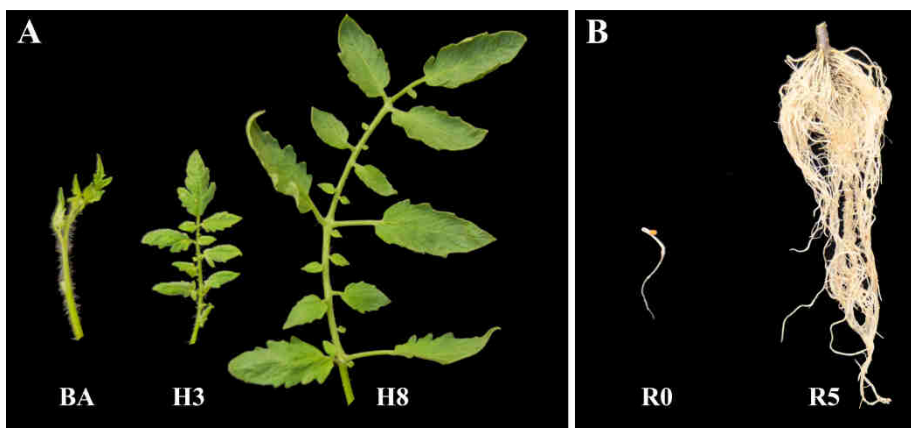
Los estudios que se recogen en esta memoria se realizaron en varios estadios de desarrollo de fruto, hoja y raíz. El material de fruto se recolectó en 4 estadios de desarrollo que correspondieron a verde inmaduro (VI), verde maduro (VM), pintón (P) y rojo maduro (RM) (Figura M-2). El estadio VI corresponde a frutos recogidos 15 días después de antesis (daa) para lo que se etiquetaron flores en antesis, se vibraron para favorecer la polinización y transcurridos 15 días se recolectaron los frutos. Estos frutos se caracterizan por ser de color verde claro y mate. La recolección de frutos en los demás estadios se hizo en base al brillo, color y grado de maduración de los mismos teniendo en cuenta además su posición en el racimo. Así, los frutos VM corresponden aproximadamente a unos 35 dda y son brillantes y de color verde más intenso. Los frutos P corresponden a unos 45 dda y se caracterizan por haber empezado a virar a naranja y los RM a 55 dda y presentan un color rojo intenso y consistencia firme. Adicionalmente, para los estudios de microscopía y expresión génica se recolectó material de ovario. Para ello, se cogieron flores en antesis y, con la ayuda de una pinza, se eliminaron los pétalos, el cono anteridial y los sépalos lo que permitió recolectar el ovario.



**Figura M-2.** Estadios de desarrollo del fruto estudiados en esta memoria: verde inmaduro (VI), verde maduro (VM), pintón (P) y rojo maduro (RM).

Los estadios del desarrollo de hoja estudiados se muestran en la Figura M-3A. Éstos correspondieron a la tercera hoja contando desde el ápice que corresponde a una hoja en fase de expansión (H4) y, por otro, a la octava hoja contando desde el ápice como hoja expandida fotosintéticamente activa (H8). Adicionalmente se recolectaron brotes apicales (BA) para los estudios de expresión génica.

Para los estudios de expresión génica en raíz se recolectaron raíces de plántulas 96 h después de la germinación (R0) y de plantas con cinco hojas verdaderas (R5) (Figura M-3B).



**Figura M-3.** Estadios del desarrollo de hoja (A) y raíz (B) estudiados en esta memoria. BA: brote apical, H3: tercera hoja contando desde el ápice, H8: octava hoja contando desde el ápice, R0: raíz de plántulas 96 h después de la germinación, R5: raíz de plantas con cinco hojas verdaderas.

### Medida de la superficie foliar

La superficie foliar se midió en 10 hojas de cada estadio (HJ y HA) y genotipo o tratamiento procedentes cada una de plantas diferentes. Las mediciones se hicieron con ayuda de un integrador de área foliar (Delta-T Devices Ltd., Reino Unido). La recolección del material se llevó a cabo de acuerdo con lo indicado en el apartado anterior.

### Determinación de la biomasa vegetal

La biomasa de hojas, tallos y frutos de las plantas de cada genotipo o tratamiento se determinó al final de la campaña. Para ello se registró por separado el peso fresco de hojas y tallos de plantas individualizadas a primera hora de la mañana para evitar errores asociados a pérdidas de agua por deshidratación a lo largo del día. En el caso de los frutos se recolectaron lotes de cinco frutos de cada una de las plantas, los cuales se pesaron y previo a su colocación en una estufa se cortaron para favorecer el secado. Tras dos

semanas de secado en una estufa a 70°C se determinó el peso seco de cada una de las partes. Todas las muestras se pesaron en una balanza analítica de 0,01 g de precisión. Se determinó el peso fresco y seco de un mínimo de seis plantas por genotipo o tratamiento.

### **Cosecha y peso medio del fruto**

La cosecha de las plantas de los distintos genotipos o tratamientos se determinó recolectando los frutos RM a medida que éstos iban madurando y anotando el número de frutos y su peso total. Se analizaron un mínimo de seis plantas por genotipo y tratamiento hasta el final de la campaña. La cosecha se estimó como el peso total en kilos que produjo cada planta y el peso medio de los frutos como el promedio entre el peso de los frutos frente al número de frutos por planta.

### **Cantidad y viabilidad del polen**

Los muestreos de flores para recolectar polen se realizaron a primera hora de la mañana y se recolectaron flores de cinco plantas por genotipo escogidas al azar entre los tres bloques. Para ello, se recogieron cinco flores abiertas por planta que se colocaron en una placa de Petri. En los casos en los que alguna planta no tenía cinco flores abiertas, se cogieron las que tuviera, anotándose el número de flores (como mínimo se recolectaron tres flores por planta). A continuación, se llevaron las placas al laboratorio y allí se les quitaron las tapas y se dejaron secar las flores al aire a temperatura ambiente durante 1 h aproximadamente, lo cual favorece la extracción del polen. Transcurrido este tiempo, se procedió a la extracción del polen para lo que se cogieron las flores por la base y, apartando los pétalos y con la ayuda de un alambre estéril con la punta aguzada, se agitaron vigorosamente las anteras sobre un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Una vez obtenida la máxima cantidad posible de polen de todas las flores muestreadas de una planta, se añadió al tubo 1 mL de medio de germinación, se agitó vigorosamente y se incubó la mezcla durante 20 min. Se empleó un medio de germinación puesto a punto para tomate (15% sacarosa, 1 mM KNO<sub>3</sub>, 0,1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,27 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1,62 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) el cual se preparó el mismo día del muestreo para evitar posibles contaminaciones microbianas debido al alto contenido de sacarosa.

Transcurridos los 20 min se añadió 400  $\mu\text{L}$  de acetocarmín al 1% (p/v) para fijar y teñir el polen y se guardaron las muestras en oscuridad para evitar la descomposición del colorante. A partir de estas muestras de polen ya hidratado, fijado y teñido se procedió a estimar su cantidad y viabilidad mediante la observación al microscopio.

Para la estimación de ambos parámetros se colocó una pequeña cantidad de muestra sobre una cámara cuenta-glóbulos de Fuchs Rosenthal, la cual tiene un volumen sobre la rejilla de 3,2  $\mu\text{L}$ . Con la ayuda de un contador manual se contaron todos los granos de polen que había sobre la cuadrícula de la cámara. Los granos de polen con morfología redondeada y teñidos se consideraron viables y los que aparecían arrugados, lisados o sin teñir, no viables. La cantidad de polen producido por flor se estimó a partir del número total de granos de polen y se relativizó al volumen total de medio de germinación (1400  $\mu\text{L}$  incluyendo el acetocarmín) y al número de flores de las que se extrajo el polen.

### **Cantidad de semillas por fruto**

Se recolectaron 10 frutos RM por genotipo procedentes de plantas diferentes escogidas al azar. Los frutos se abrieron por la mitad y se extrajeron las semillas para su conteo. Las semillas vanas no se tuvieron en cuenta en el conteo.

### **Crecimiento y maduración del fruto**

Para el estudio del crecimiento del fruto se etiquetaron 20 flores en antesis para cada genotipo o tratamiento y se midió la evolución del diámetro de los mismos cada 10 días a partir de 15 dda y hasta que el fruto alcanzó el estadio RM. Las medidas se tomaron de la zona ecuatorial de los frutos con un calibre digital. El diámetro del ovario se midió en 30 flores en antesis tras eliminar el cono anteridial, los pétalos y los sépalos. Paralelamente, se registró el estadio de desarrollo y maduración de los frutos, clasificándolos en VI, VM, P y RM, tal y como se indica en el apartado «Recolección de muestras».

### Evaluación del agrietado y microrrayado del fruto

La evaluación de estas fisiopatías se llevó a cabo en los frutos del segundo y tercer racimo de las plantas. Para ello, se recolectaron todos los frutos maduros de cada bloque y se evaluó la presencia/ausencia de agrietado y microrrayado. Adicionalmente se evaluó la severidad del agrietado en base a una escala arbitraria de 0 a 5, donde 0 equivale a ausencia de agrietado y 5 a la presencia de grietas a lo largo de toda la superficie del fruto. La Figura M-4 muestra la escala empleada.



**Figura M-4.** Escala empleada para evaluar la severidad del agrietado. El valor 0 corresponde a ausencia de agrietado; 1-5 aumento progresivo de la superficie del tomate cubierta por las grietas.

### Dureza del fruto

Las medidas se realizaron en 20 frutos RM procedentes de plantas y bloques distintos, a razón de una medida por fruto, con la ayuda de un durómetro Durofel DFT 100 (Apollinaire Ltd, Francia). Las medidas, expresadas en grados Durofel y con una escala 0 - 100, se tomaron en la zona ecuatorial de frutos sin agrietar.

### Transpiración del fruto durante la poscosecha

Se recolectaron 20 frutos RM para cada genotipo o tratamiento procedentes de plantas y bloques distintos. Se evitaron los frutos con grietas o heridas visibles. Tras medir su diámetro con un calibre digital, los frutos se dejaron a temperatura y humedad relativa ambiente y se monitorizó su pérdida de peso cada 10 días hasta su total deshidratación o hasta que los frutos agrietaron o mostraron crecimiento fúngico.

Para el cálculo de la transpiración se representó gráficamente la pérdida de peso de cada fruto frente al tiempo y se realizó un ajuste de regresión

lineal de los datos. A partir del diámetro de cada fruto se calculó el área ( $A$ ) en  $m^2$  asumiendo una forma esférica para el fruto de tomate. La tasa de flujo de agua ( $F$ ), expresada en  $kg \cdot s^{-1}$ , se obtuvo a partir de la pendiente del ajuste lineal. El flujo de agua ( $J$ ) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación (Riederer, 2006b):

$$J = \frac{F}{A} \quad (1)$$

donde  $J$  tiene unidades de  $kg \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$ .

### Determinación del contenido de sólidos solubles, acidez valorable y aceptabilidad del sabor del fruto

Para la determinación del contenido en sólidos solubles y acidez valorable se empleó el protocolo puesto a punto en el Laboratorio de Mejora Vegetal del IHSM. Para ello se trituró en un molinillo (IKA® A 11 basic, Alemania) trozos de pericarpio de cinco frutos RM. Se analizaron 10 muestras biológicas por genotipo o tratamiento. El triturado se colocó en un vial de centelleo y se congeló a  $-20^{\circ}C$ . La congelación-descongelación de las muestras facilitó aún más la rotura de la estructura tisular y celular y la liberación de los jugos. Las muestras se centrifugaron a 3600 g durante 30 min a temperatura ambiente y el sobrenadante, equivalente al jugo filtrado, se usó para las determinaciones.

Para determinar la acidez valorable se añadió 1 mL de jugo a 100 mL de agua destilada al que se le fue añadiendo una solución de NaOH 0,01 N hasta pH final de 8,1 empleando un valorador semiautomático (Schott Titroline easy, Alemania). Los mL de NaOH consumidos corresponden a meq NaOH/100 mL de jugo, que es como se expresa la acidez valorable.

El contenido en azúcares expresado como  $^{\circ}Brix$  (porcentaje de sólidos solubles) se midió colocando una gota de jugo en un refractómetro de mano digital PR-100 (Atago, Japón).

La aceptabilidad del sabor del tomate se calculó empleando la ecuación desarrollada por Malundo *et al.* (1995) a partir de un estudio de paneles de cata:

$$aceptabilidad = 5,43 + 0,51x + 2,64y - 9,00y^2 \quad (2)$$

donde  $x$  es el porcentaje de azúcares calculado a partir de los °Brix de acuerdo con la ecuación (3) asumiendo un valor de 5 °Brix en la pasta de tomate e  $y$  el porcentaje de ácidos calculado a partir de la acidez valorable siguiendo las ecuaciones (4) y (5).

$$\% \text{ azúcares} = \text{°Brix} - 5 \quad (3)$$

$$\% \text{ ácidos} = \% \text{ ácido cítrico} - 0,5 \quad (4)$$

$$\% \text{ ácido cítrico} = AV \cdot 0,064 \quad (5)$$

donde  $\% \text{ ácido cítrico}$  es la acidez valorable expresada como porcentaje de ácido cítrico y  $AV$  la acidez valorable expresada como meq NaOH/100 mL de jugo.

### Color del fruto y de la cutícula

El color de los frutos se estimó con la ayuda de un colorímetro CHROMA METER CR-400 (Konica Minolta Sensing, Japón). Al comienzo de las mediciones se calibró el aparato con una placa de calibración Minolta. Se tomaron, en diferentes zonas del fruto, tres medidas de cada fruto y se analizaron un mínimo de 30 frutos en estadio RM para cada genotipo o tratamiento. Los valores se representaron en el espacio de color CIE  $L^*C^*H^\circ$  donde  $L^*$  representa la luminosidad en una escala de grises siendo 0 negro y 100 blanco,  $C^*$  la croma o saturación, es decir, la riqueza o pureza definida como la distancia de separación de un color cromático con el color neutral (gris) y  $H^\circ$  el tono o matiz (expresado en grados), el atributo mediante el cual un color se percibe como rojo, amarillo, verde, azul, violeta, etc. (CIE, 1978).

El color de las cutículas procedentes de frutos RM se midió igualmente con el colorímetro. Dada la naturaleza translúcida de algunas cutículas el colorímetro se calibró sobre un folio blanco sobre el que se hicieron todas las medidas de color de las cutículas. Las medidas se realizaron por la cara externa y se hicieron un mínimo de 50 medidas por genotipo o tratamiento.

La contribución del mesocarpo al color final del fruto también se estimó midiendo el color en superficie de frutos RM a los que se les quitó previamente la piel. Se tomaron dos medidas por fruto y se analizaron un mínimo de 30 frutos por genotipo o tratamiento.

### Aislamiento de la cutícula

Para la extracción de las membranas cuticulares de frutos de tomate en distintos estadios de desarrollo se empleó el procedimiento descrito por Orgell (1955) y modificado por Yamada *et al.* (1964) tal como aparece en el trabajo de Petracek y Bukovac (1995). Se partió de 30 - 50 frutos tomados de todas las plantas en VM, P y RM, y de 80 - 100 frutos en VI. Los frutos recolectados se inspeccionaron visualmente para descartar aquellos que presentaban daños o irregularidades superficiales y a continuación se lavaron con agua destilada. Los frutos se cortaron por la mitad y se incubaron a 37°C en una solución acuosa de tampón citrato 20 mM pH 3,7 (Panreac, España) a la que se le añadió celulasa (1% p/v, Fluka-Sigma, USA) y pectinasa (0,2% p/v, Sigma, USA) además de azida sódica 1 mM (Sigma, USA) para prevenir el crecimiento microbiano. Transcurridos siete días, las cutículas se separaron manualmente del tejido epidérmico, se filtró la solución enzimática y se continuó la incubación siete días más. Tras este periodo se cambió la solución enzimática y se incubaron las muestras otros siete días. A continuación, se sonicaron las cutículas en un baño de ultrasonidos (Selecta, España) para facilitar la eliminación de los restos de pared celular y se lavaron exhaustivamente con agua destilada durante dos días para eliminar los restos de la solución enzimática. Tras esto, se pasaron unos segundos por metanol, se dejaron secar sobre papel de filtro a temperatura ambiente y se colocaron en desecadores con gel de sílice para su total deshidratación y posterior conservación.

### Determinación de la cantidad de cutícula

La cantidad de cutícula por unidad de área se determinó a partir de trozos de cutículas aisladas procedentes de distintos frutos a las que se les cortaron los bordes con el fin de obtener láminas planas. Las muestras se extendieron sobre un portaobjetos y se empleó un cubreobjetos que se pegó por los bordes para mantener los trozos de cutícula planos. La superficie de cada trozo se midió con el programa Visilog v 6.3 (Noiesis, Francia), previa captura de la imagen con una cámara LCC-RCA (SONY DFW-X700). Tras registrar el área, se dispusieron los portaobjetos con las muestras de cutícula en desecadores con gel de sílice para su completa deshidratación y posterior pesada en una balanza analítica de precisión 0,01 mg (Metler, España). El peso específico se expresó como cantidad de cutícula por unidad de área



( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Se realizaron 10 medidas por genotipo o tratamiento y estadio del desarrollo.

### **Análisis cuantitativo de los componentes de la cutícula**

La extracción de ceras se realizó en una mezcla de disolventes orgánicos a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 2 h. Así, a 100 mg de cutícula aislada se le añadieron 100 mL de una mezcla cloroformo/metanol (2:1 v/v). Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces con metanol. A continuación, se depositaron las muestras en el desecador durante 48 h y se pesaron para calcular el porcentaje de ceras.

En segundo lugar, se extrajeron los polisacáridos tras reflujo en una solución acuosa 6 N de HCl durante 12 h a  $80^{\circ}\text{C}$  (Baker *et al.*, 1982). Posteriormente se realizaron tres lavados con agua y dos con metanol. Tras 48 h en el desecador se pesaron las muestras y se determinó el porcentaje de polisacáridos y cutina por diferencia de pesada.

El análisis de los compuestos fenólicos se realizó tras despolimerización de la cutina a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 16 h en agitación. Así, a 10 mg de cutícula se le añadió 10 mL de una solución de KOH al 1% en metanol (p/v). La absorbancia de la solución se midió a 324 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, USA). La cantidad de fenoles totales se estimó a partir una recta patrón con concentraciones conocidas de naringenina.

### **Análisis cualitativo de ceras y cutina**

El análisis cualitativo de las ceras y la cutina de las cutículas aisladas de frutos RM procedentes de las plantas *CHIOx*, *CHI/FNSox* y MM se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Lukas Schreiber (Institute of Cellular and Molecular Botany, Bonn, Alemania). Se realizó una extracción de ceras de acuerdo con el protocolo antes mencionado. A la mezcla de disolventes se le añadió tetracosano como control interno y se evaporaron éstos bajo un flujo de nitrógeno. La despolimerización de la cutina se realizó mediante transesterificación de las cutículas sin ceras en una mezcla 1N HCl en metanol (v/v) durante 2 h a  $80^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se añadió 2 mL de una solución saturada de NaCl en agua, se extrajeron los lípidos en hexano, se añadió dotriacontano como control interno y se evaporó la fase orgánica bajo

un flujo de nitrógeno. Previo al análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) se derivatizaron las muestras de ceras y monómeros de cutina mediante la adición de *N,N*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida y su incubación a 70°C durante 40 min (Franke *et al.*, 2005). Se analizaron tres réplicas biológicas por genotipo.

### Estudio de las propiedades mecánicas de la cutícula

El estudio de las propiedades mecánicas de la cutícula se realizó con un extensiómetro diseñado para trabajar con cutículas de tomate (Matas *et al.*, 2005) equipado con un reloj comparador (Mitutoyo, Japón). Se cortaron fragmentos rectangulares de cutículas aisladas de 3 mm x 9 mm. Los segmentos de cutícula seleccionados fueron fijados al extremo de cada uno de los brazos de acero del dispositivo con una pequeña cantidad de cianocrilato (pegamento de secado rápido), de tal forma que la cutícula formara una superficie plana con el eje de desplazamiento del brazo móvil, intentando minimizar las tensiones inespecíficas propias del uso de pinzas y dispositivos similares. Todo el conjunto fue dispuesto en una cámara cerrada (Selecta, España) que permitió mantener la temperatura alrededor de 25°C y una humedad relativa en torno al 40% (Matas *et al.*, 2005). Cada muestra se mantuvo en el interior de la cámara del extensiómetro al menos 5 min antes del ensayo para permitir que se equilibrara con las condiciones del entorno.

Los ensayos mecánicos consistieron en una serie sucesiva de ensayos de fluencia. Para determinar los cambios en longitud, cada segmento de cutícula se mantuvo en tensión con carga constante durante 20 min. Durante este periodo se registró la extensión longitudinal de la muestra cada 3 s mediante la conexión del dispositivo digital del extensiómetro a un ordenador por el puerto RS232 y un software de captura de datos (Telix, deltaComm Development, USA). Cada muestra se sometió a una secuencia ascendente de tensiones sostenidas desde 0,196 N hasta que se producía la fractura, con incrementos en la carga de 0,196 N y sin permitir la recuperación de la extensión alcanzada.

El diagrama esfuerzo-deformación se obtuvo representando el esfuerzo aplicado frente a la máxima deformación longitudinal obtenida después de 20 min. Para cada muestra se calculó el módulo elástico (MPa) que se toma como medida de la rigidez de la misma, el esfuerzo en el punto de fractura

(MPa) usado como indicador de la resistencia de la muestra y la deformación máxima (% de extensión) en el punto de fractura, así como las posibles relaciones que se establecieran entre ellos a través de las condiciones de ensayo (Niklas, 1992).

### **Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR)**

Los espectros infrarrojos se determinaron en modo de reflectancia total atenuada (ATR) en un espectrómetro FTIR-4100 (Jasco, España), operando a una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Se realizaron 250 acumulaciones para cada espectro en el rango comprendido entre  $4000$  y  $600\text{ cm}^{-1}$ . Los espectros de infrarrojo se analizaron mediante el software Spectra Manager v 2 (Jasco, España).

Se analizaron tres réplicas biológicas distintas de cutina aislada por genotipo o tratamiento y estadio y se determinó el índice de esterificación (España *et al.*, 2014) de la cutina a partir de la absorción ( $A$ ) de las bandas de  $1730\text{ cm}^{-1}$  (correspondiente a la vibración de estiramiento de los grupos funcionales éster, C=O) y  $2918\text{ cm}^{-1}$  (correspondiente a las vibraciones de estiramiento asimétricas de los grupos metileno,  $\text{CH}_2$ ) de acuerdo con la ecuación:

$$\text{Índice esterificación} = \frac{A_{1730}}{A_{2918}} \quad (6)$$

Este índice permite determinar el grado de esterificación de los hidroxiácidos de la matriz de cutina.

### **Fijadores y colorantes para microscopía**

#### *FAA*

Para la preparación de este fijador se mezclaron 90 mL de etanol al 50%, 5 mL de ácido acético glacial y 5 mL de formaldehído al 37%.

#### *Gelatinización de portaobjetos*

Los portaobjetos se desengrasaron por inmersión en una solución de etanol 100% y éter dietílico (1:1 v/v) durante al menos 24 h y posteriormente se lavaron con etanol. La solución de gelatina se preparó calentando a  $60^\circ\text{C}$

en una placa calefactora 200 mL de agua destilada y disolviendo 1 g de gelatina oro (Panreac, España) y 0,1 g de sulfato de potasio y cromo (III) dodecahidrato (Merck, Alemania). Una vez preparada la solución de gelatina, los portaobjetos se colocaron en una canastilla y se sumergieron durante 10 s en la mezcla. Transcurrido este tiempo se sacaron, se dejaron al aire durante 5 min y se volvieron a sumergir en la mezcla de gelatina otros 10 s. Finalmente, se dejaron secar en una estufa a 37°C durante dos días.

### *Acetocarmín*

La solución de acetocarmín al 1% (p/v) se realizó llevando a ebullición 100 mL de una solución al 45% de ácido acético en agua a la que se le añadió 1 g de índigo carmín (Sigma, USA) y se dejó hervir suavemente hasta que se disolvió el colorante. A continuación, una vez enfriada la solución, se filtró dos veces. Las muestras de polen teñidas se observaron en un microscopio de campo claro.

### *Sudán IV*

Se preparó una solución de Sudán IV (Sigma, USA) al 0,5% (p/v) en etanol al 85%. Los cortes se tiñeron durante 15 min y seguidamente se lavaron con etanol al 50% un mínimo de tres veces hasta eliminar el exceso de colorante. Se observaron los cortes en un microscopio con campo claro, poniéndose de manifiesto la presencia de lípidos que se tiñeron de color rojo-anaranjado.

### *Azul de toluidina O*

Se preparó una solución de azul de toluidina (Sigma, USA) al 0,5% (p/v) en agua destilada (Considine y Knox, 1979). Los cortes se tiñeron durante 30 s a 60°C en una placa calefactora y se aclararon posteriormente con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante. El azul de toluidina O es un colorante policromático que permite estudiar la organización celular y tisular. Los cortes se observaron con un microscopio óptico convencional con campo claro.

### *Calcoflúor*

Se preparó una solución de Calcoflúor White M2R (Sigma, USA) al 0,1% (p/v) en agua destilada. Los cortes se tiñeron durante 5 min y se lavaron

posteriormente tres veces con agua destilada. Para la visualización de los cortes se empleó un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800 (Japón) con filtro ultravioleta. El calcoflúor se une principalmente a  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) glucanos como la celulosa emitiendo fluorescencia blanquecina cuando se excita con luz ultravioleta (Luza *et al.*, 1992).

### *Auramina O*

Se preparó una solución de Auramina O (Sigma, USA) al 0,01% (p/v) en tampón fosfato 0,05 M pH 7,8 (Considine y Knox, 1979). Los cortes se tiñeron durante 5 min y se lavaron posteriormente tres veces con agua destilada. La auramina O se utilizó para el estudio morfológico de la cutícula ya que se une de forma específica a compuestos lipídicos. Los cortes se visualizaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800 (Japón) con un filtro FITC.

Todos los colorantes preparados fueron filtrados con una membrana Filtropur (Sarstedt, Alemania) de 0,2  $\mu$ m de diámetro de poro antes de ser utilizados.

### **Cortes histológicos**

El estudio de la anatomía del pericarpo del fruto y de la hoja, incluyendo cambios en el grosor y grado de invaginación de la cutícula del fruto, se realizó a partir de cortes histológicos de muestras incluidas en resina. Se estudiaron tres réplicas biológicas procedentes de plantas y bloques distintos. Para ello se fijaron en FAA trozos de pericarpo de la zona ecuatorial del fruto y trozos de hoja en distintos estadios del desarrollo. Los estadios de fruto que se estudiaron fueron VI, VM, P y RM mientras que los de hoja fueron H3 y H5. En el caso de las hojas se seleccionó siempre el segundo foliolo (contando desde el foliolo apical), se eliminaron los bordes y se evitó la zona del nervio central.

Tras la fijación del material durante un mínimo de 24 h se procedió a su deshidratación en diluciones seriadas de etanol al 70% (dos pases de 30 min), 80% (dos pases de 30 min) y 95% (dos pases de 1 h). No fue necesaria la deshidratación total ya que la historesina (Leica, Alemania) es hidrofílica. El protocolo seguido fue el especificado por el fabricante de la resina. La

preinfiltración de las muestras se realizó en una mezcla de solución de infiltración (resina más activador) y etanol 95% (1:1, v/v) durante 1 h. Las muestras se sometieron a vacío durante unos 15 min para facilitar la penetración de la resina. Posteriormente se cambió la mezcla anterior por solución de infiltración y se incubaron las muestras durante 2 h tras unos 15 min de vacío para permitir la total infiltración de la resina en las muestras. Finalmente se trasladaron las muestras a cápsulas de polimerización BEEM® (Fedelco, España) y se incluyeron en una mezcla de solución de infiltración más endurecedor. Las muestras se dejaron polimerizar durante 2 h a temperatura ambiente.

Se realizaron cortes de 4  $\mu\text{m}$  con un microtomo de rotación (RM2125, Leica, Alemania) los cuales se depositaron sobre gotas de agua en portaobjetos gelatinizados para favorecer la adhesión del corte a los mismos y se secaron en una estufa a 37°C durante 24 h.

### **Determinación del grosor y grado de invaginación de la cutícula y del tamaño y forma de las células epidérmicas**

Las medidas se realizaron con el programa de análisis de imagen Visilog v 6.3 (Noesis, Francia) sobre imágenes digitales previamente capturadas. No se realizaron más de dos medidas por campo microscópico y de cinco por corte histológico.

Los cortes histológicos de pericarpo teñidos con Sudan IV se emplearon para medir el grosor y grado de invaginación de la cutícula. El grosor de la cutícula se midió en la zona intermedia de la célula y el grado de invaginación a partir de una escala arbitraria de 0 - 2. El grado de invaginación estima la deposición de cutícula en las paredes celulares epidérmicas anticlinales y periclinales internas, así como en las primeras capas de células colenquimáticas. De acuerdo con esta escala 0 corresponde a ausencia de cutícula en las paredes anticlinales de la epidermis, 0,5 a cutícula rodeando las paredes anticlinales, 1 a cutícula rodeando además las paredes periclinales internas de las células epidérmicas, 1,5 cuando la cutícula rodea adicionalmente las paredes anticlinales de la primera capa de colénquima y 2 cuando la epidermis y la primera capa celular del colénquima están completamente rodeadas de cutícula. Se realizaron un mínimo de 30 medidas

para el grosor y el grado de invaginación para cada genotipo o tratamiento y estadio del desarrollo.

Las medidas de tamaño y forma de las células epidérmicas se realizaron a partir de cortes teñidos con azul de toluidina O. Se midió el área y perímetro de las células epidérmicas, así como los diámetros radiales y tangenciales de las mismas. Se realizaron 60 medidas para cada genotipo o tratamiento y estadio del desarrollo.

### **Microscopía electrónica de barrido**

La forma y tamaño del grano de polen, la superficie de la hoja y del fruto se inspeccionaron con un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-840, Japón) acoplado a un sistema de adquisición digital de imágenes. El material de hoja y fruto ya fijados se deshidrató en una serie de diluciones de etanol al 50%, 70%, 80%, 90% (dos pases de 30 min en cada una de las diluciones) y 100% (dos pases de 1 h). No fue necesario deshidratar el polen. A continuación, las muestras se sometieron a secado por punto crítico y finalmente se recubrieron con una capa de oro coloidal para darle propiedades conductoras al tejido. Este paso se llevó a cabo en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Málaga.

### **Densidad de células epidérmicas**

A partir de imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de barrido se hicieron conteos del número de células epidérmicas del fruto por unidad de superficie, así como del número de estomas, tricomas y células del pavimento de la hoja. Se tomaron imágenes de 18 campos microscópicos de tres muestras biológicas distintas procedentes de plantas diferentes. Se calculó la superficie en mm<sup>2</sup> de cada imagen con el programa Visilog v 6.3 (Noiesis, Francia). Las muestras correspondieron a la zona ecuatorial de los frutos y al segundo foliolo de la hoja evitando el nervio central y los bordes del foliolo. En el caso de la hoja se analizaron tanto el haz como el envés.

### Bioinformática

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los genes y proteínas estudiados en la presente memoria fueron obtenidas de la base de datos *Sol Genomics Network* (SGN, <http://solgenomics.net/>) mediante búsqueda directa, en el caso de genes anotados, o a través de búsqueda de ortólogos mediante el uso de BLAST, en el caso de genes no anotados. El diseño de cebadores se realizó con el programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Las secuencias y características de los cebadores se incluyen en los Anexos II y III de esta memoria. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las familias génicas CHALCONA SINTASA (CHS), CHALCONA ISOMERASA (CHI), FLAVANONA 3 HIDROXILASA (F3H) y FLAVONOL SINTASA (FLS) se realizó con el programa ClustalX (Larkin *et al.*, 2007). El análisis filogenético se llevó a cabo con el programa PAUP\* (Swofford, 2002) y se empleó el método de parsimonia acompañado de un análisis de *bootstrap* con 1000 repeticiones. Para la representación de los árboles filogenéticos se emplearon los programas TreeView X (Page, 1996) y Mesquite v 3.2 (Maddison y Madisson, 2017).

Cuando se estimó oportuno se comparó los datos de expresión obtenidos en esta memoria con los depositados en la base de datos *Tomato Functional Genomics* (<http://ted.bti.cornell.edu/cgi-bin/TFGD/digital/home.cgi>), los cuales se obtuvieron por diferentes metodologías para distintos tejidos y genotipos de tomate.

### Extracción y purificación de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó con DNAzol® (Invitrogen, USA) para la determinación del número de copias del transgen y con DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Alemania) para el cálculo de las eficiencias de los cebadores. En ambos casos se siguieron las indicaciones dadas por los fabricantes. La cantidad de ADN se estimó con un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, España) a partir de la absorbancia a 260 nm y la calidad del mismo a partir de las ratios de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$ ,  $A_{260}/A_{270}$  y  $A_{260}/A_{230}$  como indicadores de contaminación con proteínas, fenol y carbohidratos, respectivamente. La ratio  $A_{260}/A_{280}$  estuvo entre 1,7 - 1,9, la ratio  $A_{260}/A_{270}$  entre 1,0 - 1,2 y la ratio  $A_{260}/A_{230}$  entre 1,9 - 2,3.



En todos los casos se usaron hojas jóvenes procedentes de brotes, las cuales fueron congeladas en N<sub>2</sub> líquido inmediatamente tras su separación de la planta, trituradas hasta tener un polvo fino y guardadas a -80°C o procesadas inmediatamente.

### Extracción y purificación de ARN y síntesis de ADNc

Se extrajo ARN de ovario en antesis y de epicarpo, mesocarpo, hoja y raíz en diferentes estadios de desarrollo. Las muestras recolectadas en el invernadero se transportaron al laboratorio en frío donde se lavaron con una solución acuosa de detergente y se aclararon con abundante agua bidestilada. En los frutos, el aislamiento del epicarpo y mesocarpo se realizó con ayuda de cuchillas de doble filo. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido, se trituraron en morteros previamente tratados para inactivar las RNasas asegurándose de mantener el tejido congelado durante todo el proceso y se almacenaron a -80°C. La extracción de ARN se realizó con TRIzol® (Invitrogen, USA) en los tejidos de mesocarpo y epicarpo VM, P y RM ya que permite partir de cantidades mayores de material. Posteriormente, el ARN se sometió a un tratamiento con 4 U de DNasa I recombinante (RNase-free DNase set, QIAGEN, Alemania) durante 30 min para eliminar cualquier resto de ADN genómico. A continuación se empleó el kit NucleoSpin® RNA Clean-up (Macherey-Nagel, Alemania) para limpiar el ARN de cualquier impureza. La extracción de ARN en el resto de los tejidos se hizo con el kit RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Alemania) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Se realizaron tres extracciones de ARN por tejido y genotipo o tratamiento procedentes de muestras biológicas diferentes.

La cantidad y calidad inicial del ARN se estimó con un Nanodrop 1000. Los ratios de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$ ,  $A_{260}/A_{270}$  y  $A_{260}/A_{230}$  estuvieron comprendidos entre 1,9 - 2,1, 1,0 - 1,2 y 1,9 - 2,3 respectivamente. Adicionalmente, la calidad del ARN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE 1x.

La síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN total se llevó a cabo con el kit Super Script III First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR (Invitrogen, USA) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Finalizado este proceso, las muestras de ADNc se diluyeron a la

mitad. Se realizaron tres síntesis de ADNc por tejido y genotipo o tratamiento a partir del ARN extraído de cada una de las tres réplicas biológicas.

### PCR cuantitativa a tiempo real

La identificación de las plantas *CHIOx* y *CHI/FNSox* homocigotas y hemicigotas y el estudio de los niveles de expresión de los genes de interés en distintos estadios del desarrollo para diferentes genotipos o tratamientos se llevó a cabo mediante qPCR en un termociclador Bio-Rad C1000 con sistema de detección CFX96™ Real-Time PCR Detection System acoplado (Bio-Rad, USA).

#### *Determinación del número de copias del transgén*

Como controles para la identificación de las plantas *CHIOx* y *CHI/FNSox* homocigotas y hemicigotas se emplearon plantas transgénicas cedidas por el Dr. Juan Capel (Universidad de Almería) que contienen el gen *NEOMICINA FOSFOTRANSFERASA II (NPTII)* en homocigosis (dos copias) o en hemicigosis (una copia) confirmado por hibridación *southern blot*. Este gen, cuya expresión en plantas confiere resistencia al antibiótico kanamicina, se encuentra también incluido en el T-DNA de las plantas *CHIOx* y *CHI/FNSox*.

La qPCR se realizó por triplicado para cada muestra usando el kit comercial SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante para un volumen final de 20 µL con una concentración 0,25 µM de cebadores y 150 ng ADN por reacción. Las condiciones utilizadas fueron las específicas para ADN genómico, usando como temperatura de anillamiento 58°C durante 10 s. Se empleó como gen de referencia *SHN* (Solyc06g053230). Las secuencias (5'-3') de los cebadores empleados fueron las siguientes:

NPTII\_Fw: ATACTTTCTCGGCAGGAGCA

NPTII\_R: CTGTGCTCGACGTTGTCCT

SHN\_Fw: CAAGAGCGTATGATGAAGCA

SHN\_R: TCCTTGCAACATTTCTCAG

Para la determinación del número de copia se empleó el método comparativo Cq ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ) descrito por Livak y Schmittgen (2001) y que ha sido utilizado con éxito para la determinación del número de copia de

transgenes (Ingham *et al.*, 2001). Esta cuantificación se basa en la comparación entre la cantidad de ADN del transgen con respecto a la del gen de referencia.

*Niveles de expresión*

El estudio de expresión génica se realizó a partir de ADNc procedente de distintos tejidos y genotipos o tratamientos mediante RT-qPCR empleando el kit SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante para un volumen final de reacción de 20 µL con una concentración 0,125 µM de cebadores y 25 ng ADNc por reacción. Para cada gen, estadio del desarrollo y genotipo o tratamiento se analizaron tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una. Las condiciones de PCR se detallan en la Tabla M-3. Se registró la fluorescencia al final de cada ciclo de amplificación y durante la curva de fusión.

**Tabla M-3.** Condiciones de amplificación empleadas para el estudio de los niveles de expresión génica.

Condiciones	Tiempo	Temperatura
1x		
Desnaturalización/Activación	3 min	95°C
40x		
Desnaturalización	15 s	95°C
Anillamiento	15 s	58°C
Extensión	20 s	72°C
1x		
	10 s	95°C
Curva de fusión	5 s	65°C
		65-95°C*

\*Incremento de temperatura de 0,5°C

Se seleccionaron tres genes de referencia para cada tejido en base a lo publicado en la bibliografía de tomate y se comprobó su estabilidad en los estadios del desarrollo, genotipos y tratamientos estudiados en esta memoria. Estos genes fueron *CAC* (Solyc08g006960), *SAND* (Solyc03g115810) y *Expressed* (Solyc07g025390) para epicarpo y mesocarpo de fruto y para raíz (Expósito-Rodríguez *et al.*, 2008) y *EFa1* (Solyc06g005060), *CAC* y

*Expressed* para hoja (Rotenberg *et al.*, 2006). Las secuencias de los cebadores empleados se muestran en los Anexos I y II.

La eficiencia de los cebadores se determinó a partir de la pendiente ( $m$ ) de una recta de calibrado en la que se representaron los valores de  $Cq$  (eje de ordenadas) frente al logaritmo de distintas concentraciones de ADN genómico (eje de abscisas). Se analizaron siete diluciones de ADN que comprendieron un rango de tres órdenes de magnitud siguiendo las directrices indicadas por Bustin *et al.* (2009). Estas diluciones fueron: 0,5, 0,2, 0,05, 0,02, 0,005, 0,002 y 0,0005  $\mu\text{g}/\text{reacción}$ . Se realizó un ajuste de regresión lineal de los datos para cada pareja de cebadores y se calculó la eficiencia ( $Ef$ ) de dichos cebadores y el factor de amplificación ( $E$ ) de acuerdo con las siguientes fórmulas (Rasmussen, 2001):

$$Ef = 10^{\left(\frac{-1}{m}\right)} - 1 \quad (7)$$

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{m}\right)} \quad (8)$$

El error estándar ( $SE$ ) del factor de amplificación se calculó siguiendo la ecuación descrita por Hellemans *et al.* (2007):

$$SE(E) = \frac{E \cdot \ln 10 \cdot SE(m)}{m^2} \quad (9)$$

donde  $SE(m)$  es el error estándar de la pendiente, el cual se obtuvo del análisis de regresión.

Los niveles de expresión génica se expresaron como cantidades relativas ( $RQ$ ) siguiendo el modelo matemático comparativo  $\Delta Cq$  descrito por Pfaffl (2001) que tiene en cuenta la eficiencia de cada gen y modificado por Vandesompele *et al.* (2002) para incluir varios genes de referencia:

$$RQ = \frac{\sqrt[3]{\prod_{end1}^{end3} E_{end}^{Cq_{end}}}}{E_{goi}^{Cq_{goi}}} \quad (10)$$

donde  $end$  es el gen de referencia,  $goi$  el gen de interés y  $Cq$  el ciclo en el que se alcanza una fluorescencia determinada (threshold) igual para todas las muestras de una misma placa.



El coeficiente de variación ( $CV$ ) de cada gen endógeno y el coeficiente de variación medio ( $\overline{CV}$ ) de los tres genes de referencia se calculó de acuerdo con Hellemans *et al.* (2007):

$$CV = \frac{SD(RQ_{end})}{RQ_{end}} \quad (11)$$

$$\overline{CV} = \frac{\sum_{end1}^{end3} CV_{end}}{n} \quad (12)$$

donde  $SD(RQ_{end})$  es la desviación estándar de la cantidad relativa de un gen de referencia para todas las muestras,  $\overline{RQ_{end}}$  la media de la cantidad relativa de un gen de referencia para todas las muestras,  $n$  el número de genes de referencia. Para el cálculo de la cantidad relativa de cada gen de referencia ( $RQ_{end}$ ) se empleó la ecuación antes indicada relativizando cada gen de referencia al conjunto de los tres genes de referencia.

La eficiencia de los cebadores también se calculó con ayuda del programa de análisis de datos de PCR cuantitativa a tiempo real LinRegPCR v 2014.4 (Ramakers *et al.*, 2003; <http://LinRegPCR.nt>). Este programa calcula la eficiencia de la amplificación a partir del ajuste de regresión lineal de un subconjunto de datos de la fase exponencial logarítmica de la curva de amplificación (Ruijter *et al.*, 2009). Para ello es necesario corregir la línea base y determinar la ventana de linealidad y el umbral de fluorescencia. La línea base se define como la fluorescencia detectada antes de la amplificación específica y es debida a la fluorescencia del propio ADNc, de los cebadores o del fluoróforo no unido al ADNc. La ventana de linealidad corresponde a un subconjunto de puntos de la fase exponencial usados para la estimación de la eficiencia de la amplificación. El umbral de fluorescencia es una cantidad fija de fluorescencia que determina el valor Ct.

Los datos obtenidos con el programa CFX Manager™ v 3.1 se exportaron al programa LinReg, el cual llevó a cabo una corrección de la línea base de cada muestra por separado, determinó la ventana de linealidad para cada amplicón y realizó un análisis de regresión lineal para determinar la eficiencia de la amplificación a partir de la pendiente de la fase exponencial de la curva de amplificación. Se determinó, para cada pareja de cebadores, la eficiencia promedio de los distintos estadios del desarrollo y genotipos o tratamientos estudiados. Dicha eficiencia promedio del ensayo fue la que se

empleó para el cálculo de las cantidades relativas de acuerdo con Remans *et al.* (2014).

### Análisis estadísticos

El análisis estadístico de todos datos se realizó con ayuda del programa informático SPSS Statistics v 23 (IBM Corp., NY, USA). Previamente al análisis de los datos, se comprobó que los datos presentaran una distribución normal y que las varianzas fueran homogéneas. Las pruebas empleadas para ello fueron la de Kolmogorov-Smirnov y la de Levene, respectivamente. Cuando la variable a analizar fue un porcentaje, los datos se transformaron mediante la transformación angular para mejorar la normalidad de la distribución:

$$\arcsen^2\sqrt{\text{porcentaje}/100} \quad (13)$$

Los valores y medias de las distintas variables de porcentaje empleadas en esta memoria se presentan en escala real, aunque los análisis estadísticos se realizaron con los datos transformados.

Para la comparación de medias entre dos muestras independientes se utilizó la prueba T de Student. El análisis del posible efecto de la variable tratamiento o genotipo sobre un carácter dado se llevó a cabo mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA). Para la ordenación de los niveles de una variable en cuanto a la magnitud del carácter dado se utilizó una prueba de comparación múltiple de medias a posteriori. Concretamente se empleó la prueba Tukey b en aquellos casos en los que las varianzas fueron homogéneas y la de Games-Howell cuando las varianzas no lo fueron.

Se realizaron análisis de regresión lineal de los valores de las rectas de calibrado para la cuantificación de fenoles totales en la cutícula y en el fruto, para el cálculo de la eficiencia de los cebadores, y para el análisis de la transpiración del fruto durante la poscosecha. Estos análisis se realizaron con un mínimo de siete medidas y con  $R^2 > 0,99$ .

Para el análisis de correlación entre los datos de Ct y la concentración de ADN para el cálculo de la eficiencia de los cebadores se empleó el coeficiente de correlación lineal de Pearson.

# CAPÍTULO 1

## METABOLISMO DE LOS FLAVONOIDES: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS

*"La verdadera ciencia enseña, sobre  
todo, a dudar y a ser ignorante"*  
*Miguel de Unamuno*



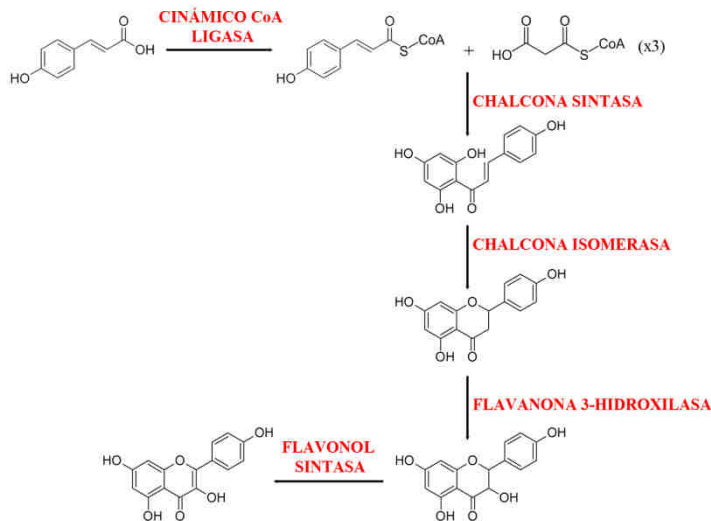


UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## INTRODUCCIÓN

Los flavonoides son una clase de compuestos del metabolismo secundario que juegan un amplio número de funciones en plantas, desde la protección frente a la luz UV o la coloración de flores y frutos hasta el transporte polar de auxinas y el control del crecimiento de órganos, por citar sólo algunas (Li *et al.*, 1993; Mol *et al.*, 1998; Peer y Murphy, 2007; Buer y Djordjevic, 2009). La acumulación de flavonoides en tomate se ha estudiado especialmente en fruto donde se ha detectado un aumento de los mismos durante la maduración (Meléndez-Martínez *et al.*, 2010). Concretamente los principales flavonoides que se acumulan en fruto son la chalconaringenina seguida de quercetina y kaempferol (Slimestad y Verheul, 2009). De estos compuestos sólo la chalconaringenina se detecta en la cutícula de los frutos maduros (Hunt y Baker, 1980; Baker *et al.*, 1982). En tomate son pocos los trabajos que han estudiado la composición cualitativa de los flavonoides de hoja, si bien se ha identificado la acumulación de quercetina y kaempferol junto con la de antocianos (Mathews *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2015). Por su parte en raíz la concentración de flavonoides es bastante inferior al resto de los tejidos (Groenenboom *et al.*, 2013; Silva-Beltrán *et al.*, 2015) aunque se ha destacado la presencia de flavononas y flavonoles (Zornoza *et al.*, 1984).



**Figura 1-1.** Esquema del inicio de la ruta de biosíntesis de los flavonoides indicando las enzimas involucradas en la biosíntesis de los flavonoides presentes en tomate.

Los flavonoides que se acumulan en la planta de tomate son producto de la actividad de las enzimas CHALCONA SINTASA (CHS), CHALCONA ISOMERASA (CHI), FLAVANONA 3 $\beta$ -HIDROXILASA (F3H) y FLAVONOL SINTASA (FLS) (Figura 1-1). CHS es el primer enzima de la ruta de los flavonoides. Cataliza la condensación secuencial de tres unidades de acetato procedentes de la condensación descarboxilativa de malonil-CoA con una molécula de cumaroil-CoA, y posteriormente lleva a cabo una ciclación intramolecular del tetraquetido lineal (Ferrer *et al.*, 2008). CHS pertenece a la superfamilia de poliquétido sintasa tipo III (PKS III) de plantas y bacterias (Austin y Noel, 2003). La familia PKS III de plantas comparten una similitud de secuencia aminoacídica entre 30-95% (Abe y Morita, 2010). Las tres superfamilias de PKS muy probablemente evolucionaron de las enzimas elongadoras de ácidos grasos del metabolismo primario, con las que comparten varias características de plegamiento y un modo de acción común (Ferrer *et al.*, 1999; Austin y Noel, 2003). La duplicación y divergencia del gen *CHS* en plantas ha dado lugar a una familia de enzimas relacionadas que difieren en la molécula sustrato, el número de unidades de acetato que condensan o el patrón de ciclación intramolecular (Austin y Noel, 2003). La CHS es un homodímero que contiene dos sitios activos funcionalmente independientes formados cada uno por residuos del mismo monómero (Tropf *et al.*, 1995; Ferrer *et al.*, 1999). El estudio cristalográfico de la CHS ha permitido la identificación de los residuos que definen el sitio catalítico, así como los responsables del bolsillo donde ocurre la reacción de ciclación (Ferrer *et al.*, 1999). Los estudios estructurales sugieren que las enzimas PKS III emergieron a partir de las cetoacil sintasas tipo III (KAS III), responsables de la condensación del acetil CoA con una molécula de malonil CoA (Ferrer *et al.*, 2008; Abe y Morita, 2010).

CHI cataliza la ciclación de la chalconaringenina y la 6'-deoxichalcona (isoliquiritigenina) en (2*S*)-naringenina y (2*S*)-5-deoxiflavanona (liquiritigenina), respectivamente. En condiciones naturales ambos sustratos, chalconaringenina y 6'-deoxichalcona, son capaces de ciclar espontáneamente para producir naringenina y 5-deoxiflavanona. Sin embargo, sólo los isómeros (*S*) son biológicamente activos, por lo que la CHI garantiza la formación del isómero con actividad biológica al tener una preferencia aparente 10000:1 por el isómero (*S*) frente al (*R*) (Jez *et al.*, 2000). En un principio se postuló que esta enzima era específica de plantas ya que no se conocían secuencias o estructuras similares fuera del reino vegetal

(Jez *et al.*, 2000); sin embargo, estudios posteriores han permitido identificar genes homólogos en hongos y en algunas bacterias (Gensheimer y Mushegian, 2004). En plantas se ha identificado la presencia de dos tipos de CHI (Kimura *et al.*, 2001; Shimada *et al.*, 2003). El tipo I es común a todas las plantas vasculares y es responsable de la conversión de la chalconaringenina a naringenina. Por su parte el tipo II parece ser específico de las *Fabaceae* y son capaces de convertir además la isoliquiritigenina en liquiritigenina. Adicionalmente se han identificado otros dos tipos de CHI. Las CHI tipo III están presentes en plantas vasculares y algas y, recientemente, se han identificado como proteínas que se unen a ácidos grasos (FAPs) (Ralston *et al.*, 2005; Ngaki *et al.*, 2012). El silenciamiento de estas CHI tipo III en *A. thaliana* alteró los niveles de ácidos grasos y al mismo tiempo afectó a la reproducción (Ngaki *et al.*, 2012). Por su parte, las CHI tipo IV no tienen función conocida y son específicas de plantas vasculares (Ralston *et al.*, 2005; Ngaki *et al.*, 2012). Recientemente, el estudio de dos CHI tipo IV de *I. nil* y *A. thaliana* mostró que estas enzimas participan en la síntesis de flavonoides, postulándose un mecanismo cooperativo con la CHI tipo II (Morita *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2015). El estudio cristalográfico de la CHI tipo II de *Medicago sativa* L. ha permitido la identificación de los aminoácidos que participan en el sitio activo, así como de aquellos que influyen en la preferencia de sustrato (Jez *et al.*, 2000). El análisis de secuencia de las proteínas CHI tipo III y IV mostró sustituciones en algunos de los aminoácidos claves para la unión de la enzima al sustrato (Ngaki *et al.*, 2012; Dastmalchi y Dhaubhadel, 2015).

F3H cataliza la  $3\beta$  hidroxilación de las 2S-flavononas para dar lugar a 2R,3R-dihidroflavonoles. Pertenece a la familia de dioxigenasas dependiente de 2-oxoglutarato/Fe(II), la cual se caracteriza por emplear un intermediario Fe(IV)-oxo para dar lugar a diversas reacciones oxidativas (Martínez y Hauseinger, 2015). Se trata de una familia de enzimas que participa en numerosos procesos biológicos como el metabolismo de ácidos grasos o la biosíntesis de metabolitos secundarios (Martínez y Hausinger, 2015). Además, tiene una distribución ubicua, estando presente en bacterias, plantas, hongos y vertebrados (Martens *et al.*, 2010). FLS cataliza la desaturación de los 2R,3R-dihidroflavonoles a flavonoles. Se trata de una enzima que pertenece a la misma familia de dioxigenasas que la F3H (Wellmann *et al.*, 2002). Esta familia de dioxigenasas requieren 2-oxoglutarato y Fe(II) como cofactores para la unión del oxígeno molecular. Adicionalmente, el

ascorbato, aunque no es esencial, favorece la reacción enzimática y se cree que participa manteniendo el estado del Fe(II) (Clifton *et al.*, 2006; Prescott y John, 1996). El estudio cristalográfico de diferentes enzimas de esta familia permitió la identificación de diversos residuos importantes para su función (Hegg y Que, 1997). Así, se ha destacado una tríada, 2-His-1-carboxilato, responsable de la unión al Fe(II) y un motivo R<sub>x</sub>S responsable de la unión al 2-oxoglutarato (Hegg y Que, 1997; Clifton *et al.*, 2006), los cuales se han descrito en diversas dioxigenasas responsables de la síntesis de flavonoides (Britsch *et al.*, 1993; Lukačín *et al.*, 1997, 2000; Wilmouth *et al.*, 2002; Tu *et al.*, 2016).

Como ya se ha mencionado en la *Introducción general*, en un gran número de especies vegetales, incluyendo el tomate, los genes responsables de la biosíntesis de flavonoides están representados por varios miembros, formando familias multigénicas de hasta 12 ó 15 miembros (Koes *et al.*, 1989a; O'Neill *et al.*, 1990; Sparvoli *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 1997; Durbin *et al.*, 2000; Shimada *et al.*, 2003). En varias especies los distintos miembros de una misma familia génica han presentado diferentes patrones de expresión e incluso se han identificado varias señales ambientales y del desarrollo que controlan su activación (Ryder *et al.*, 1987; Koes *et al.*, 1989a; van Tunen *et al.*, 1988; Durbin *et al.*, 2000; Hoang *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016). En tomate se han identificado dos genes *CHS*, *CHS1* y *CHS2*, que se expresan en fruto de tomate (O'Neill *et al.*, 1990; España *et al.*, 2014b) y cuyo silenciamiento indujo cambios significativos a nivel de cutícula y de calidad de fruto (Schijlen *et al.*, 2007; España, 2012; España *et al.*, 2014b). Sin embargo, se desconoce si el resto de los genes *CHS* tienen expresión en fruto, si son específicos de tejidos o estadios del desarrollo o si se expresan en respuesta a diferentes estreses bióticos o abióticos. Igualmente, sólo dos genes *CHI* y uno *F3H* de tomate están descritos en la bibliografía, en ambos casos relacionados con mutaciones que afectan a la acumulación de antocianos en el tejido vegetativo (Mathews *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2014; Maloney *et al.*, 2014).

Dado el papel relevante de los flavonoides en la calidad nutricional, en distintos caracteres relacionados con la calidad externa de los frutos, su participación en el control del crecimiento y la arquitectura de diversos órganos y en la defensa frente a diversos estreses, así como la conexión entre el metabolismo de ácidos grasos y de flavonoides, se planteó el estudio de

expresión de los diversos miembros de las familias génicas CHS, CHI, F3H y FLS, responsables de los principales flavonoides que se acumulan en la planta de tomate.

## RESULTADOS

### I. Análisis de las secuencias de proteínas

En el genoma de tomate hay anotados ocho genes como *CHS* o *CHS-like* (<https://solgenomics.net/>). Los identificadores de los loci junto con el nombre asignado a cada una de ellas se encuentran en el Anexo I. De todos los genes sólo *CHS1* y *CHS2* se han estudiado en la bibliografía (O'Neill *et al.*, 1990) y están anotados con estos símbolos. La notación de *CHS3* y *CHSA* procede de la base de datos de tomate y se debe a su similitud con otras *CHS* conocidas. Al resto de las *CHS* se les ha asignado en este trabajo un nombre similar para facilitar su identificación.

Las secuencias de las proteínas se tomaron de la base de datos de Solanaceas (<https://solgenomics.net/>) y los marcos de lectura abiertos y las traducciones se comprobaron a partir de las secuencias de genómico depositadas en esta misma base de datos. En el caso de *CHS3* se detectaron discrepancias en el marco de lectura. Por un lado, la traducción del ADNc identificó 45 aminoácidos al inicio de la proteína que no estaban incluidos. Por otro, el segundo intrón anotado en este gen no fue confirmado como tal por ninguno de los programas empleados. Este supuesto intrón no alteraba el marco de lectura, pero eliminaba una región conservada que incluía uno de los aminoácidos catalíticos. En base a estos resultados se decidió no emplear para los análisis la secuencia de *CHS3* de la base de datos sino la modificada.

La Figura 1-2 muestra el alineamiento de proteínas de las distintas *CHS*. Se observó una considerable similitud de secuencia entre las distintas proteínas anotadas como *CHS* estando el mayor grado de divergencia en el extremo N-terminal. Las proteínas *CHS1* y *CHS2* muestran una gran similitud entre sí, del 92%. Por su parte, *CHS7* y *CHSA* tienen un 74 y 70%, respectivamente de identidad con *CHS1*. *CHS3* y *CHS4* están más alejadas del resto con una similitud con *CHS1* del 43 y 45%, respectivamente. *CHS5* y *CHS6* no son proteínas enteras, sino que se corresponden con fragmentos C-terminal y N-terminal, respectivamente. Se trata de dos genes que se encuentran contiguos en el genoma de tomate, separados por 10,6 kb aproximadamente. Estas relaciones entre las distintas *CHS* se confirman en el árbol filogenético de la Figura 1-3A. En él se observa que *CHS3* y *CHS4* formaron un grupo separado, mientras que *CHS7*, *CHSA*, *CHS5* y *CHS6* mostraron una posición intermedia entre el grupo anterior y el formado por

CHS1 y CHS2. La eliminación de las dos CHS incompletas del análisis no modificó las relaciones entre el resto, pero sí mejoró la confianza de algunas ramas del árbol (Figura 1-3B).

```

CHS1 -----MVTVEEYRKAQRAEG-----
CHS2 -----MVTVEEVRRAQRAK-----
CHS5 -----
CHS7 -----MIKCLCSNLPSSAKIVTIEEFHKAQRAEG-----
CHSA -----MKLENGQKIGRVHERAEG-----
CHS6 -----
CHS3 MPIVLSTQLNQLFSKQIYLTIIYTSFSNMFVTISYQRYHSILSPNMSHNKNVNGASNHFRLR
CHS4 -----MGILEKMEGRNEINF-----

CHS1 ----PATILAIGTSTPSNCVDQSTYPDYFRITNSEHKTTELKEKFKRMCDKSMIKKRYMHLTE
CHS2 ----PATIMAIGTATPSNCVDQSTYPDYFRITNSEHMTELKEKFKRMCDKSMINKRYMHLTE
CHS5 -----
CHS7 ----LANVLAIGTANPSNCIDQSTYPDYFFRITNSEHKSSELKRKFKQMCATIMIKKRYLHLTE
CHSA ----PAKILAIGTATPFHWVDQTSYPDYFKVTNNEHLVLDKEKFRICSRMTMIRKRHMLLLE
CHS6 -----MLLARDQKSKRDFYLTE
CHS3 PTPGKATILAIGKALPPQLVLPQDCLVEGYMRDNTNCKDL-RIKEKLERLCKTTTVKTRYTVMSK
CHS4 ---GNATILALGKAFPHQLVMQEFVLVDGYFKNTNCDDP-ELKQRLTRLCKTTTVKTRYVVMSE

CHS1 EILKENPNMCAYMAPSLDARQDIVVVEVPKLGKEAAQKAIKEWGPQKSKITHLVFCT^TS^SGVDM
CHS2 EILKENPNICEYMAPSLDARQDIVVVEVPKLGKEAAQKAIKEWGPQKSKITHVVFCT^TS^SGVDM
CHS5 -----
CHS7 EILKKNPNICDYNTPSFDAKQKTIIEIVPKLGQEEAAQKAIKEWGPISKITHLVFCT^TS^SGVDM
CHSA EILKKNPNLCSYNGPSLDIRQDILVSEIPKLGKEAALRAIDWAQPKSNITHLVFCTR^SGVDM
CHS6 EILKRNPNICEYNAPSLNIRQEIIMTVEVPKLGKEAAEKAINEWQSKSKITHLVFCT^TS^SGVDI
CHS3 EILEKYPELATEGTPTINQRLEIANEAVVEMAKEASLACIKEWGRSVDEISHIVYVSSSEIRL
CHS4 EILKYPELAVEGLPTVKQRLDICNAAVTEMAIEASQSCIKKWRPISDITHVVYVSSSEARL

CHS1 +PGCDYQLAKLLGLRPSVKRMLMYQQ+GCFAG+GTVLR-LAKDLAENNKGARVLVVCSE-IT-AV-TFR
CHS2 +PGADYQLTKLLGLRPSVKRMLMYQQ+GCFAG+GTVIR-LAKDLAENNKGARVLVVCSE-IT-AV-TFR
CHS5 -----
CHS7 +PGADSQLTKLLGLDPSVKRFMLYQQ+GCSGGA+AVLRLAKDLAENNKARVLVVCSE-LINLMSFQ
CHSA +PGADYQLINLLGLSPSVQRFFMYQQ+GCFAG+GTMLRLAKDLAENNKARVLVVCSE-IAESS-AIGFR
CHS6 +PRADYQLTKLLGLESSVKRFMYQQ+GCFGG+TALQLDKDIAENNKARVLVVCSE-IT-AV-TFR
CHS3 +PGGDLHLSTELGLRSDVGRVMLYFL+GCGY+GGV-TGLRVAKDIAENNPGRVLLTSET-TT-ILGFR
CHS4 +PGGDLYLAKGLGLNPETKRVMLYFAG+CSCG+VAGLRVAKDIAENNPGRVLLATSET-TT-IIGFK

CHS1 +GPESHLDLSLVGQAL+FGD+GAAAIIGSDPIIGVERPLFELVLSAAQTLVPDSEGA^LD^HLREV+G
CHS2 +GPSDTHLDSVMGQAL+FGD+GAAAMIIGSDPLPEVERPLFELVLSAAQTLVPDSEGA^LD^HLREV+G
CHS5 -----MNVEKPLFKLVFATQTL+LLNSKNTIT+GELSEAG
CHS7 GPRD+TDLV+LVGQAFSS+DGASAVIIGSDPIIP+IERPLFELVFTTQTL+LPNSESAT+YNSLSEAG
CHSA GPSEAYPDNLIAQAL+FGD+GAVAVIIGSDPKMGLERPVEIVSAGQTFV+PNGDCHLALH+LREMG
CHS6 -----
CHS3 PPNNARPYDLVGAAL+FGD+GAAAVIIGTEPIIGTESPF+IELNFAMQQFLPGTK+NV+IDGR+LRTDEG
CHS4 PPSVDRPYDLVGVAL+FGD+GAGAMTIGSNPIRDIERPLFELHTAIQHFLP+DETEKI+IDGR+LRTTEEG

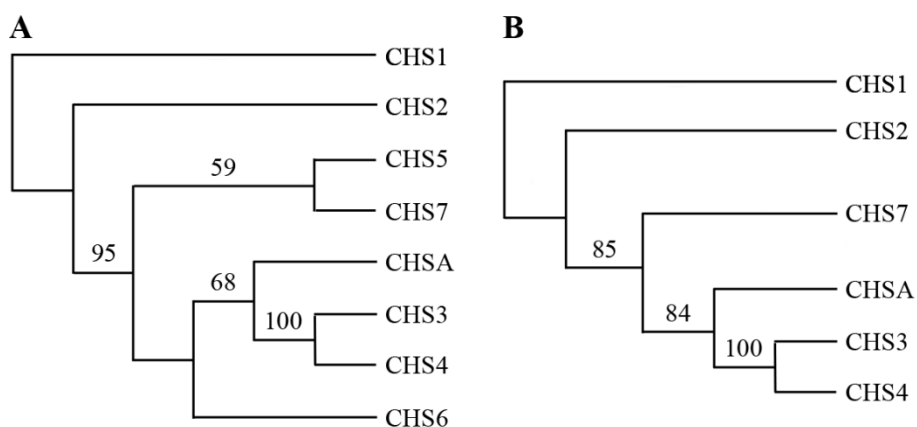
CHS1 ^LT+FHLLKDV+PGLISK+NIE---KSLEAFQPLGISD+WNSLFWIAH+PGGPA+ILDQVELK+LGLKPE
CHS2 ^LT+FHLLKDV+PGLISK+NIE---KSLEAFQPLGISD+WNSIFWIAH+PGGPA+ILDQVELK+LGLKPE
CHS5 LIV+VIH+KD+NSLLISK+NIE---KILVEAFQPLNISD+WNSIFWVSH+PGGPA+ILDQIELK+LGLKLE
CHS7 LI+IHI+KEV+PMLIST+NIE---KILLEGFQPLGISD+WNSIFWVAH+PGGPA+ISDQIELK+LGLKPE
CHSA LT+FHCTR+DVPPAIAK+NVE---SCLIKAFEPLGISD+WNSVFWIL+PGGPA+IVDQVENILGLEPD
CHS6 -----SELANLVCFRSPY+G-----T
CHS3 INF+KLGRDLPEKIQENIEEFCKKLI+AKRDELQGSNYNDLFWAVH+PGGPA+ILDRLEK+TMK+LQNE
CHS4 IS+FKLERELPQI+IEDNIEDFC+DKLINISG-IK+DREYNK+LFWAVH+PGGPA+ILNRLEK+KL+DLSPD
    
```



**Figura 1-2.** Alineamiento de proteínas de los distintos miembros de la familia CHS de tomate. Se señalan con distintos colores aquellos aminoácidos importantes para el funcionamiento de la proteína CHS de acuerdo con Ferrer *et al.* (1999). En negrita (\*) aminoácidos que definen el sitio activo, en rojo (+) aminoácidos conservados que conforman la geometría del sitio activo, en verde (^) aminoácidos conservados del bolsillo de ciclación y en azul (-) aminoácidos importantes conservados. Alineamiento realizado con el programa Clustal X.

Los residuos responsables de la actividad catalítica de la enzima CHS fueron estudiados por Ferrer *et al.* (1999) empleando la CHS3 de *Medicago sativa* L. Así en la Figura 1-2 se identifican en negro los cuatro aminoácidos que definen el sitio activo. Todos ellos, Cys, His, Phe y Asn estuvieron presentes en las CHS de tomate con excepción de CHS5 y CHS6 que, al ser fragmentos, ninguna contuvo todos los aminoácidos que definen el sitio activo. Así, la Cys se localizó en CHS6 y la His y Asn en CHS5, no estando presente la Phe en ninguna de ellas. Los aminoácidos responsables de la geometría del sitio activo también estuvieron altamente conservados, en rojo en la Figura 1-2. CHS7 fue la única que mostró divergencia en una de las regiones que contiene los aminoácidos catalíticos, concretamente en la de la Phe catalítica. Un menor grado de conservación se observó para los aminoácidos del bolsillo de ciclación (Figura 1-2, en verde). Sólo en CHS1 y CHS2 se identificaron todos ellos, las otras cuatro CHS mostraron distinto grado de divergencia. En CHS7 y CHS3 las sustituciones fueron conservadas, se mantuvieron las propiedades físico-químicas de los aminoácidos, pero en CHSA los cambios fueron no conservativos (ej. Thr por Arg ó Gly por Leu). Finalmente, los aminoácidos importantes que contribuyen a la estabilización de la molécula en el sitio activo también mostraron un grado de conservación variable, estando todos ellos conservados en CHS1 y CHS2 (Figura 1-2, en azul).





**Figura 1-3.** Árboles filogenéticos consenso de la familia CHS de tomate. **A**, incluyendo las secuencias CHS5 y CHS6. **B**, excluyendo CHS5 y CHS6. Análisis realizado con el método de parsimonia. Los números indican los valores del análisis de *bootstrap*.

Adicionalmente, se realizó una búsqueda en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de secuencias CHS conocidas de diversas especies vegetales con el fin de analizar las relaciones de los distintos miembros de la familia CHS de tomate con ellas. En este estudio no se incluyó CHS5, CHS6 ni fragmentos CHS de otras especies. La Tabla del Anexo III muestra las especies seleccionadas y el número de secuencias CHS incorporadas en el análisis de cada una de ellas. Para el análisis filogenético se empleó FABH de *E. coli* como *outgroup*. Se trata de una enzima condensadora de ácidos grasos que pertenece a la misma superfamilia de poliquétidos sintasa tipo III de la que forma parte la CHS. Tras un primer análisis filogenético se observó que en algunos casos todas las CHS de una misma especie formaron grupos separados del resto. Tal fue el caso de las cinco CHS de *M. sativa*, las seis de *G.max* o las tres de *P. pinaster*, por ello, y para facilitar la visualización del árbol, se decidió reducir en estos casos el número de CHS a una por especie.

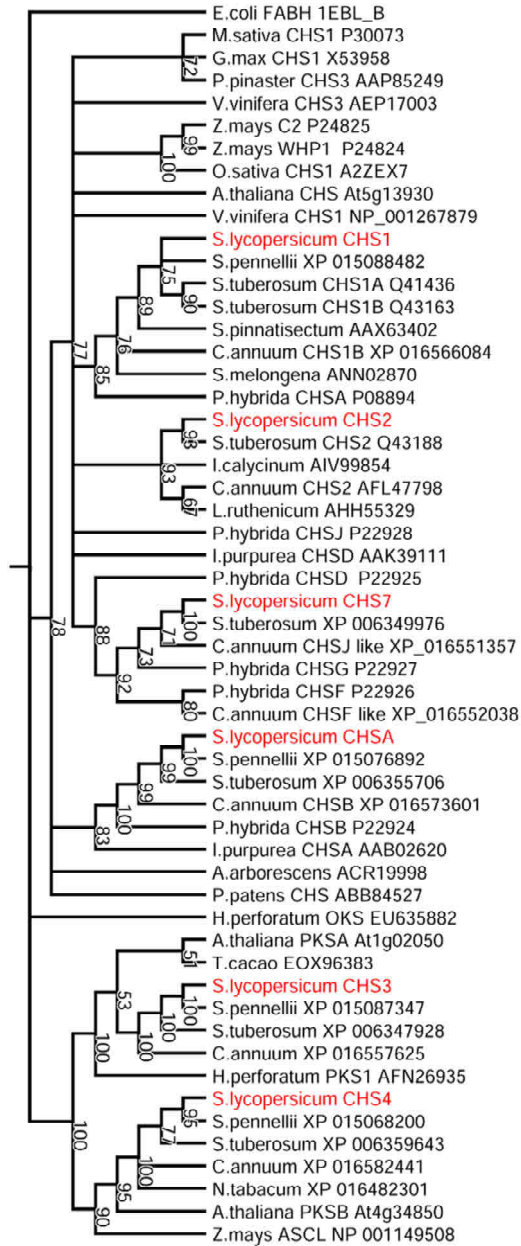
La Figura 1-4 muestra el árbol filogenético consenso de CHS de diversas especies. En general, las especies con mayor número de CHS incluidas en el estudio, *C. annum*, *P. hybrida*, *Z. mays* y tomate, presentaron una gran distribución de las mismas a lo largo del árbol. En el caso de arroz, a pesar de que sólo había tres secuencias CHS, éstas mostraron una gran divergencia. En tomate, CHS4 se agrupó con ASCL de maíz, una CHS-like específica de antera y con PKSB de *A. thaliana* y un poco más separada con CHS3 de tomate y PKSA de *A. thaliana* formando un grupo bastante robusto. El resto

de las CHS de tomate se localizaron en grupos diferentes. Por su parte, CHSA de tomate agrupó con las CHSB de pimiento y petunia y con la CHSA de *I. purpurea*, formando también un grupo robusto. Lo mismo ocurrió con CHS7 que se agrupó con CHSJ-like de pimiento, CHSG de petunia y más alejadamente con otras de pimiento y petunia. CHS1 y CHS2 se agruparon por separado con sus ortólogos de patata y pimiento.

Como ya se mencionó en la *Introducción*, en tomate CHI también constituye una familia de varios miembros, concretamente siete (<https://solgenomics.net/>). Los identificadores de los loci de cada una de las CHI junto con el nombre que se les ha asignado se encuentran en el Anexo I. En la Figura 1-5 se muestra el alineamiento de proteínas CHI de tomate. Al contrario de lo observado para CHS, la similitud entre ellas es baja. Sólo CHI2 y CHI3 muestran un porcentaje de identidad alto, del 75%. El resto de ellas tienen una similitud del 20-30% en el mejor de los casos. La proteína *chi* es la más disímil del resto mientras que CHI7 posee un extremo N-terminal más largo y distinto de las demás. En la Figura 1-6 se presenta el árbol filogenético consenso de las CHI de tomate. CHI5 y CHI7 se agruparon y fueron junto con *chi* las más alejadas de CHI2 y CHI3, mientras que el resto presentó una posición intermedia.

Jez *et al.* (2000) estudiaron los aminoácidos involucrados en la unión de la naringenina a la CHI e identificaron 13 residuos que conformaron el sitio activo. Sólo CHI2, CHI3 y CHI4 mostraron diferente grado de conservación de estos residuos (Figura 1-5, en verde). Concretamente en CHI3 se identificaron todos ellos y en CHI2 once. Por su parte, en CHI4 sólo cuatro de estos residuos estuvieron conservados. Dos de estos residuos del sitio activo, Thr190 y Met191 (numeración basada en la secuencia de *M. sativa* según Jez *et al.*, 2000), se postula que influyen en la preferencia de sustrato de la CHI y se ha observado que en especies de plantas no leguminosas están reemplazados por Ser e Ile ó Ser y Met (Jez *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Shimada *et al.*, 2003). Esto fue lo que se observó en CHI2 (Ser-Met) y CHI3 (Ser-Ile). Los aminoácidos del entramado de puentes de hidrógeno que contribuyen a la reacción estuvieron poco conservados y sólo en CHI3 se identificaron todos (Figura 1-5, asteriscos). Finalmente, los aminoácidos conservados entre CHI de diferentes especies mostraron también un mayor grado de conservación en las CHI2 y CHI3 y en menor medida en CHI4

(Figura 1-5, en azul). Sólo unos pocos de éstos estuvieron conservados en el resto de las CHI de tomate.

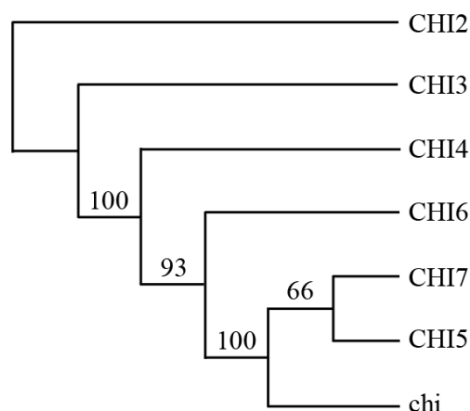


**Figura 1-4.** Árbol filogenético de CHS de varias especies de plantas. Se empleó la proteína FABH de *E. coli* como *outgroup*. Análisis realizado con el método de parsimonia. Los números indican los valores del análisis de *bootstrap*. En rojo, las proteínas CHS de tomate.



**Figura 1-5.** Alineamiento de proteínas de los distintos miembros de la familia CHI de tomate. Se señalan con distintos colores aquellos aminoácidos importantes para el funcionamiento de la proteína de acuerdo con Jez *et al.* (2000). En negrita (\*) aminoácidos que definen el entramado de puentes de hidrógeno del sitio catalítico, en verde (+) aminoácidos del sitio de unión de la (2S)-naringenina y en azul (^) otros aminoácidos importantes conservados. Alineamiento realizado con el programa Clustal X.

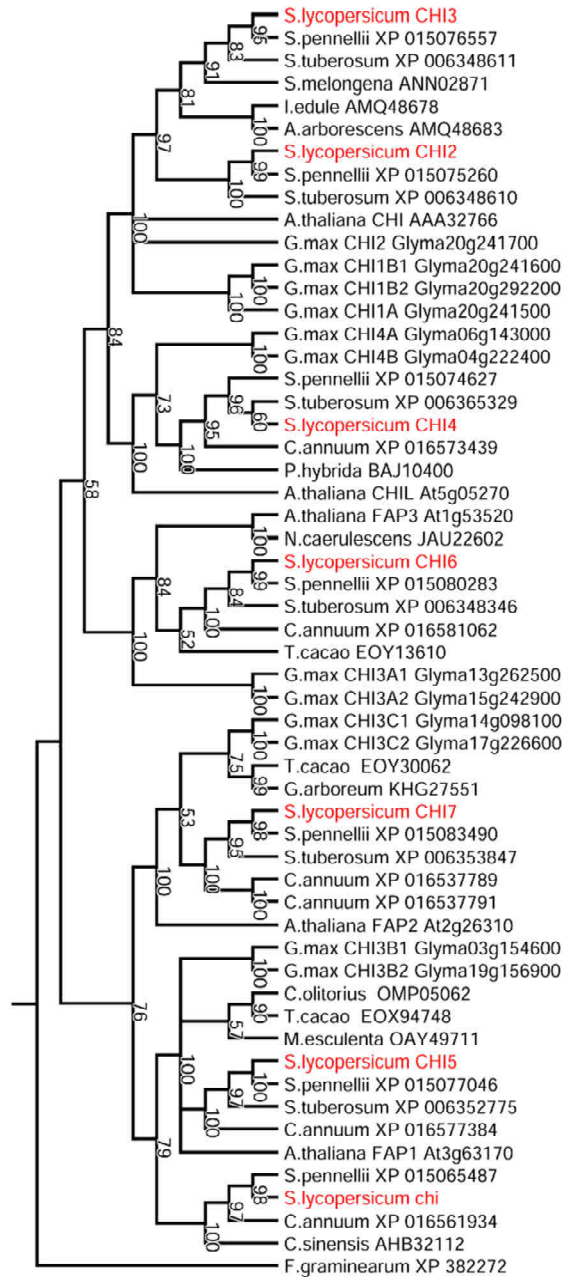




**Figura 1-6.** Árbol filogenético consenso de la familia CHI de tomate. Análisis realizado con el método de parsimonia. Los números indican los valores del análisis de *bootstrap*.

Al igual que ya se hiciese para la familia CHS, se realizó una búsqueda en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de secuencias CHI conocidas de diversas especies vegetales para establecer las relaciones de los distintos miembros de la familia CHI de tomate con ellas. La Tabla del Anexo III muestra las especies seleccionadas y el número de secuencias CHI incorporadas en el análisis de cada una de ellas. Para el análisis filogenético se empleó una proteína del hongo *F. graminearum* homóloga de la secuencia de aminoácidos CHI1A de *G. max* como *outgroup* (Dastmalchi y Dhaubhadel, 2015). De nuevo, para facilitar la visualización del árbol, se decidió reducir el número de CHI llevando el mismo criterio que en el caso de la familia CHS.

La Figura 1-7 muestra el árbol filogenético consenso de CHI de diversas especies. En este caso, CHI2 y CHI3 agruparon con varias secuencias de proteína con función CHI conocida y con varias secuencias CHI putativas de *G. max*, mientras que CHS4 de tomate agrupó con la proteína CHIL de *A. thaliana*. Por su parte, el resto de las CHI de tomate agruparon con las diferentes secuencias FAP de *A. thaliana*. Así, chi y CHI5 de tomate aparecieron formando un grupo robusto junto con FAP1, las secuencias CHI3B1 y CHI3B2 de *G. max* y otras secuencias de pimiento y patata. CHI7 apareció en el mismo clado que FAP2 de *A. thaliana* junto con las CHI3C de *G. max* mientras que CHI6 apareció agrupada con FAP3 y las secuencias CHI3A de *G. max*.



**Figura 1-7.** Árbol filogenético de CHI de varias especies de plantas. Se empleó una proteína del hongo *F. graminearum* homóloga de la secuencia de aminoácidos CHI1A de *G. max* como *outgroup*. Análisis realizado con el método de parsimonia. Los números indican los valores del análisis de *bootstrap*. En rojo, las proteínas CHI de tomate.

La hidroxilación de la flavanona para dar lugar a dihidroflavonoles y posteriormente flavonoles es realizada por las enzimas flavanona 3-hidroxilasa (F3H) y flavonol sintasa (FLS), respectivamente. En el genoma de tomate hay ocho genes identificados como *F3H*, de los cuales cuatro están anotados como potenciales *F3H-FLS*. Adicionalmente, hay un único gen anotado como *FLS*. Se realizó un análisis previo comparativo entre las proteínas anotadas como F3H por un lado y F3H-FLS por otro y se observó que no había diferencias a nivel de secuencia que sustentaran la necesidad de estudiarlas por separado. Es por ello que, dada la similitud funcional y de secuencia proteica, se decidió estudiar todas estas proteínas como una única familia. Como en los casos anteriores, los identificadores de los loci de cada una de las F3H-FLS junto con el nombre que se les ha asignado en este trabajo se encuentran en el Anexo I.

La Figura 1-8 muestra el alineamiento de proteínas de la familia F3H-FLS de tomate. Como ya ocurrió en la CHS, varias de las F3H se correspondieron con fragmentos. Así, a F3H6-FLS le falta el extremo C-terminal de la proteína, mientras que F3H7-FLS es un fragmento C-terminal y F3H8 un fragmento anterior del extremo C-terminal. Como ya se observó con CHS5 y CHS6, las F3H7-FLS y F3H8 corresponden a genes contiguos en el genoma de tomate separados por 16 kb aproximadamente.

Mientras que las estructuras de las enzimas CHS y CHI han sido estudiadas por cristalografía de rayos X y se conocen los aminoácidos de los sitios catalíticos, no hay realizado ningún trabajo similar con la F3H ó FLS. Sin embargo, se han identificado algunos aminoácidos que participan en el sitio activo favoreciendo la unión al hierro y al 2-oxoglutarato (Lukačín *et al.*, 1997, 2000; Tu *et al.*, 2016). Como se puede observar en la Figura 1-6 ambos motivos están conservados en todos los miembros de la familia con excepción de F3H6, F3H7-FLS y F3H8.

```

F3H1  MAPSTLTALANEKTLTETSFIIRDEEERPKVAYNKFSDEIPVISLQGIIDVNGRRSEICERIVNA
F3H8  -----
F3H5  -----
F3H2  ----METLRVQLLAEKSEISVSPSQYVPPETRPQIEKTNVKSAPVVIDLNSRNTLLDELKKA
F3H3  ----METKVISSGINHSTLPQSYIRPESDRPRLSEVVDCE--VPIIDLSCGDQAQIIRQIGEA
F3H6  ---MMTTTSLVSSGFNHSTLPQSYVRPESQRPCMSSEVSDDLVVPVIDMSCTDRNVIVHQIGEA
FLS1  -----MENIISSKVETLPPTYVIPMHERP-LASVPVKE-IPVIDLGEEQ-TVVAQQLVKA
F3H4  ----MENNLVSNWCKNVQTLPESYIFPEDERPGEPIVPLSGS-SPIIDLTTHQ-HDQAQIKA
F3H7  ----MEKHNTKWFNVCEVPCFTFSHEERPGDAHIPICTK-IPVIDVGKSQKNETIKQLLQA
-----

F3H1  CEDWGVFQVIDHGVDAQLISQMTKLAKKEFF---ELPPEEKLRFDMSSGGKGGFIVSSHLQG-E
F3H8  -----
F3H5  CKEWGVFQVINHKVPISELLDDIMRVGRTFFGGCEMEEKLKYSCDSASPASEGYSRMLVASNE
F3H2  CQTYGFFQVINHGVPKEVVEKMLGVAGEFFNLVVEEKLKLYSDDP---SKTMRLSTSFNVKKE
F3H3  CRLYGFFQVINHGVSKKAMDEMLG-----TMRLSTSFNVKKE
F3H6  LEQYGFFQVTNHGVPENLMDKAMEVYEEFFNLPMEEKENYANV----AKILYTSNRKNYNSK
FLS1  SQDFGYFQVINHGISETLLEETVDVLKEFFEMPAKAKAYYSVDPN--SKCKLYTSTMNYSNE
F3H4  GQDFGFFQVINHGISENVATQALSTFEFFNNITDEDKVVNAS----RKGWMTGSEEEVKN
F3H7  -----

F3H1  VVQDWREIVTYFSYPIRARDYSRWPDKPQGWIGVTEQYSEKLMDLACKLLEVLSEAMGLEKEA
F3H8  -----
F3H5  TVLDWRDYFDHHTLPLSRNRTSHWPDSPADYRQVVAEYSDHMKALAQELGLVSESLDLCQC
F3H2  TVHNWRDYLRLHGYPLEKYAP-EWPSNPPSFRIVSRYCREIRQLGFRLEEAIAESLGLDKCE
F3H3  TVHNWRDYLRLHGYPLDKYAP-EWPSNPPSFRIVSKYCMVEVRELGYRLEEAIESLGLDKCE
F3H6  EHXYLKEILEHNSNIDGQDKR-IWPSNPPYIRDVIGSYSSEVRKLSMIFDLVSKGLGLEEGY
FLS1  DKHYWRDALAHCHPIQHFLP-FWPEKPTRYREVISAYSIETRKLIITKISDVISEGLGLEKGY
F3H4  GVHLWRDNKIKHCPHLHKCMQ-SWDPKPASYRQVGRYVAEIRKLSLTILELIGQLGLESY
F3H7  -----

F3H1  LTKACVDMDQKVVVNFYPKCEPDLTLGLKR^^HTD^PGTITLLQDQVGGGLQATKDNKGTWITVQ
F3H8  ----MGTMAINVKYYPTCPNPSITIWSSRRHYDMSCTLLLFQDKTGGLYVRGTKGNWIIHIT
F3H5  IENVVGEFYQNTITISYYPCCPQPELTLGLQS^HSDF^FGVITLLIQDDVGGLEVFNN--GEWVSVN
F3H2  IKDVLGEQGHMAINYYPCCPQPELTYGLPA^HTD^PNSLTILLQDLQVAGLQVLKD-GKWLAVK
F3H3  IKNVLGEQGHMAINFYPCPQPELTYGLPA^HTD^PNAITILLQDLQVAGLQVLKD-GKWLAVK
F3H6  FG---KDEHQKMIVHHFPVCPGSSSTLGMGD^HCD^PNLITIIYQQ-
FLS1  FGG-ELSKVQMLLVNCPYPCPDPNLALGMHS^HCD^PNLFTILLQDNVCG-LQIFKD-GKWIAVE
F3H4  FD--EQSQVQLLSANNYPCCPDPSTLGLILK^HLD^PSLITIIYQGNVSG-LQVLVD-GKWMVCE
F3H7  -----

F3H1  PVEGAFVNLGDHGHYLSNGRFKNAD^HQAVVNSNSS^RLS^IATFQNPAPDAKVYPLKIREGEKS
F3H8  PIKCALVNVNIGDSMHMSNDRYK-IIEQCASDLSTTR^IYCTAILNSSLDSVTGPFPP-----
F3H5  PMSNAICVILADQTEIITNGEYKSAQ^HRAVTNAGRS^RLS^IATFHDPAKTRQISVPVHPRHRP
F3H2  PQPDAFVINLGDQLQAVSNGKYRSVW^HRAIVNSDQ^ARMS^VASFLCPCDSAKIS-APKLLTEDG
F3H3  PQPNAFVINLGDQLEALSNGKYKSW^HRAIVNSDKA^ARMS^VASFLCPCDNCISIIIS-APKLLTEDG
F3H6  PIPNAFVVIIGCQLQIISNNKLSVI^HRAVTNSKET^TR^ICVGNFVIPSDDCHIEPASDLVNGTT
FLS1  AVPNFAFVNVNIGNQLEMI SNGMLRSVM^HRAVTNSKEA^RTS^IALFVNPTPNSIVEPAKVLLN-ES
F3H4  -----MSNDRYKSV^HC^VAVDSSRA^RS^IVPLFVNPCFDSVIGPFSQMLK-DG
F3H7  -----

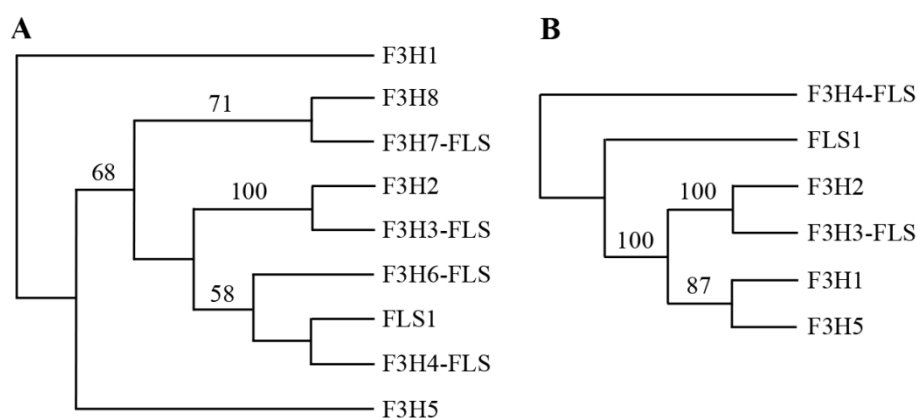
F3H1  IMDEPITFAEMYRRKMSKDLELARLKLAKKEEKIQTEEAKLESKPIEEILA
F3H8  -----
F3H5  VIYGDHVSSWYTKGPEGKRNLDALLL-----
F3H2  SPVLYQDFTYAEYKFWSRNLDQQC^HCLFLFKN-----
F3H3  SSAIYRDFTYAEYKFWSRNLDQEYCLEL^FKNDGT-----
F3H6  -----
FLS1  NIPAYKPYQYKEFLHTYATNHGDFEAVLQSYKL-----
F3H4  NPPLYKSHLYKDFINASKAFAHTDAIQNDV-----
F3H7  EKPVYKHLVFSDYWNYFRKRPSGKASLDFAKI-----

```

**Figura 1-8.** Alineamiento de proteínas de los distintos miembros de la familia F3H-FLS de tomate. En rojo (^) se señalan los aminoácidos responsables de la unión a Fe(II) y en verde (\*) los involucrados en la unión al 2-oxoglutarato. Alineamiento realizado con el programa Clustal X.



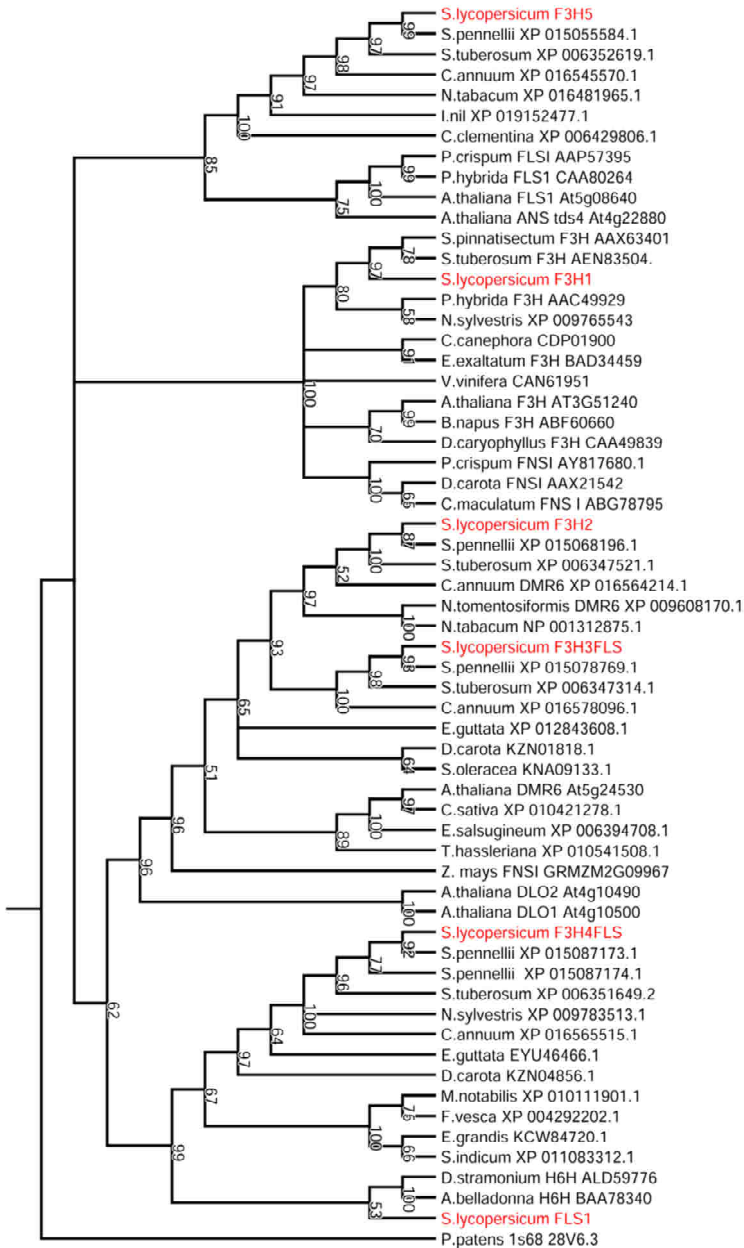
La Figura 1-9 presenta los árboles filogenéticos consenso de la familia F3H-FLS incluyendo y sin incluir las secuencias proteicas incompletas. Así F3H2 agrupó con F3H3-FLS mostrando ambas la similitud de secuencia encontrada dentro de esta familia, 75%. Los fragmentos C-terminal F3H7-LS y F3H8 formaron un grupo igualmente y presentaron una identidad del 54%. Por su parte, F3H4-FLS y FLS1 formaron también un grupo junto con la F3H6-FLS. La eliminación de las secuencias incompletas no modificó las relaciones entre las secuencias, pero sí mejoró la confianza de las ramas del árbol (Figura 1-7B). Finalmente, F3H1 y F3H5 agruparon entre sí.



**Figura 1-9.** Árbol filogenético consenso de la familia F3H-FLS de tomate. **A**, incluyendo las secuencias F3H6-FLS, F3H7-FLS y F3H8. **B**, excluyendo las anteriores secuencias. Análisis realizado con el método de parsimonia. Los números indican los valores del análisis de *bootstrap*.

La Figura 1-10 muestra el árbol consenso de las secuencias F3H y FLS de diversas especies encontradas en la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (ver Tabla anexo III). Para el análisis filogenético de esta familia se empleó la secuencia 1s68 28V6.3 de *P. patens* como *outgroup*. Esta proteína pertenece a la clase DOXC2 de la superfamilia de las dioxigenasas dependientes de Fe(II) y 2-oxoglutarato (Kawai *et al.*, 2014). F3H1 de tomate agrupó con las proteínas con función F3H conocida de diversas especies como *P. hybrida* y *A. thaliana*. F3H2 y F3H3-FLS de tomate agruparon en un mismo clado que incluye la proteína DMR6 (DOWNY MILDEW RESISTANCE) de *A. thaliana* y su homólogo en maíz, *N. tomentosiformis* y *C. annuum*. Por su parte F3H5 de tomate agrupó con las proteínas de función FLS y ANS (ANTOCIANINA SINTASA) conocida. Finalmente, FLS1 y F3H4-FLS de tomate se localizaron en otro clado donde

la única proteína con función conocida fue H6H (HIOSCIAMINA 6-HIDROXILASA) de *D. stramonium* y *A. belladonna*.

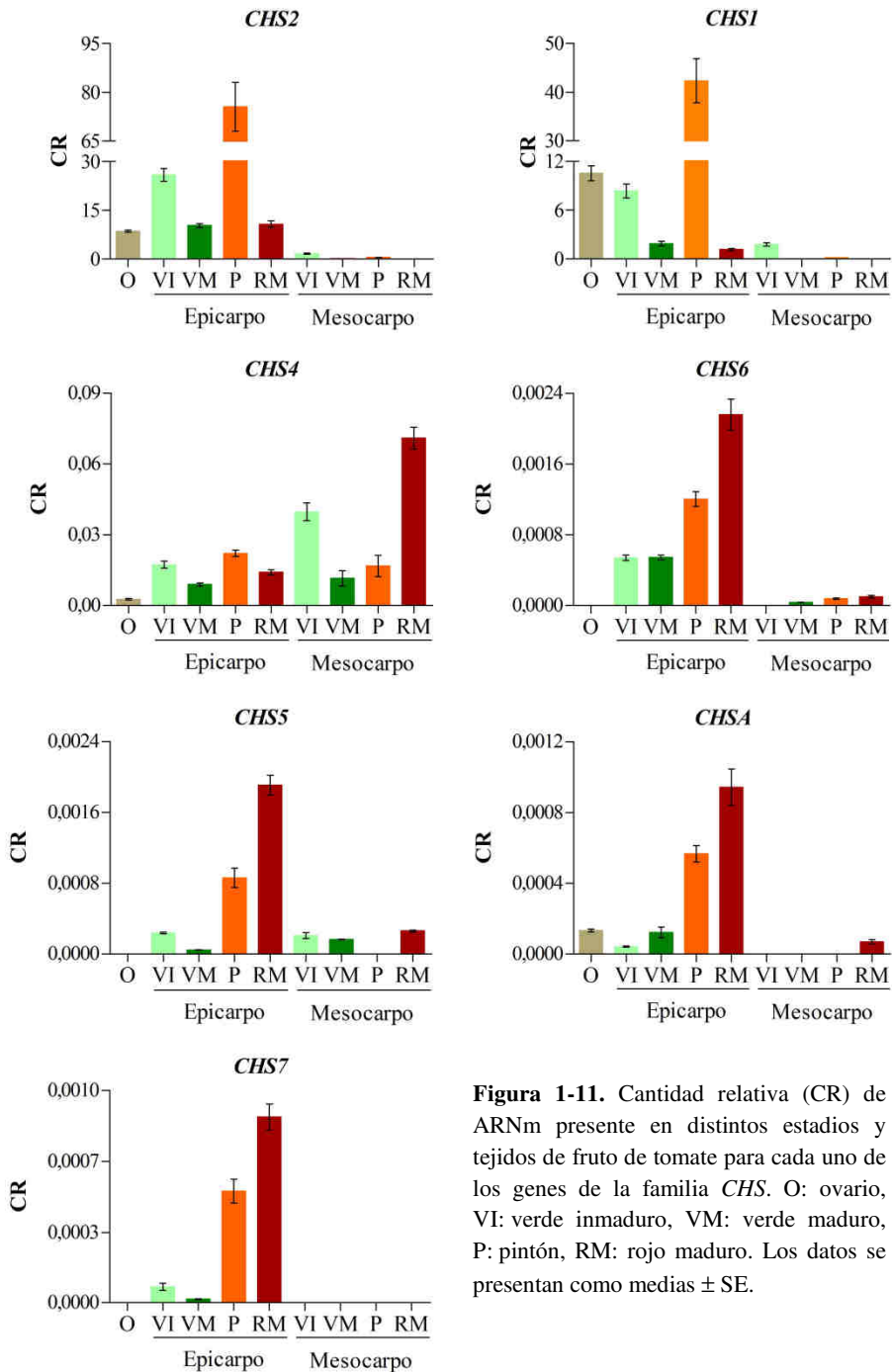


**Figura 1-10.** Arbol filogenético de F3H y FLS de varias especies de plantas. Se empleó la proteína 1s68V6.3 de *P. patens* como *outgroup*. Análisis realizado con el método de parsimonia. Los números indican los valores del análisis de *bootstrap*. En rojo, las proteínas F3H y FLS de tomate.

## II. Análisis de expresión génica

La selección de los genes endógenos para los análisis de expresión se realizó a partir de la información proporcionada por Expósito-Rodríguez *et al.* (2008) para distintos tejidos de planta de tomate. En fruto de tomate se seleccionaron los estadios de ovario en antesis y fruto en verde inmaduro, verde maduro, pintón y rojo maduro. En los estadios de fruto se estudiaron por separado el epicarpo y mesocarpo. Esta separación de tejidos no se llevó a cabo en el ovario dado el tamaño del mismo. Los genes seleccionados para los diferentes estadios del desarrollo y tejidos de fruto fueron *CAC*, *EXP* y *SAND*. Dichos genes presentaron un coeficiente de variación entre estadios y tejidos de fruto de 0,21 por debajo del 0,25 considerado como máximo aceptable para un panel homogéneo de tejidos o estadios (Hellemans *et al.*, 2007). En el caso de la hoja se escogieron tres estadios que correspondieron a brote apical, tercera y octava hoja contando desde el ápice. Los genes endógenos empleados fueron *CAC*, *EFa1* y *EXP*, y presentaron un coeficiente de variación entre estadios de 0,17. Finalmente se estudiaron dos estadios del desarrollo de raíz, uno 96 horas después de la germinación de la semilla y otro correspondiente a la raíz de una planta con cinco hojas verdaderas. Los genes endógenos que se seleccionaron mostraron un coeficiente de variación de 0,12 y fueron *CAC*, *SAND* y *EXP*.

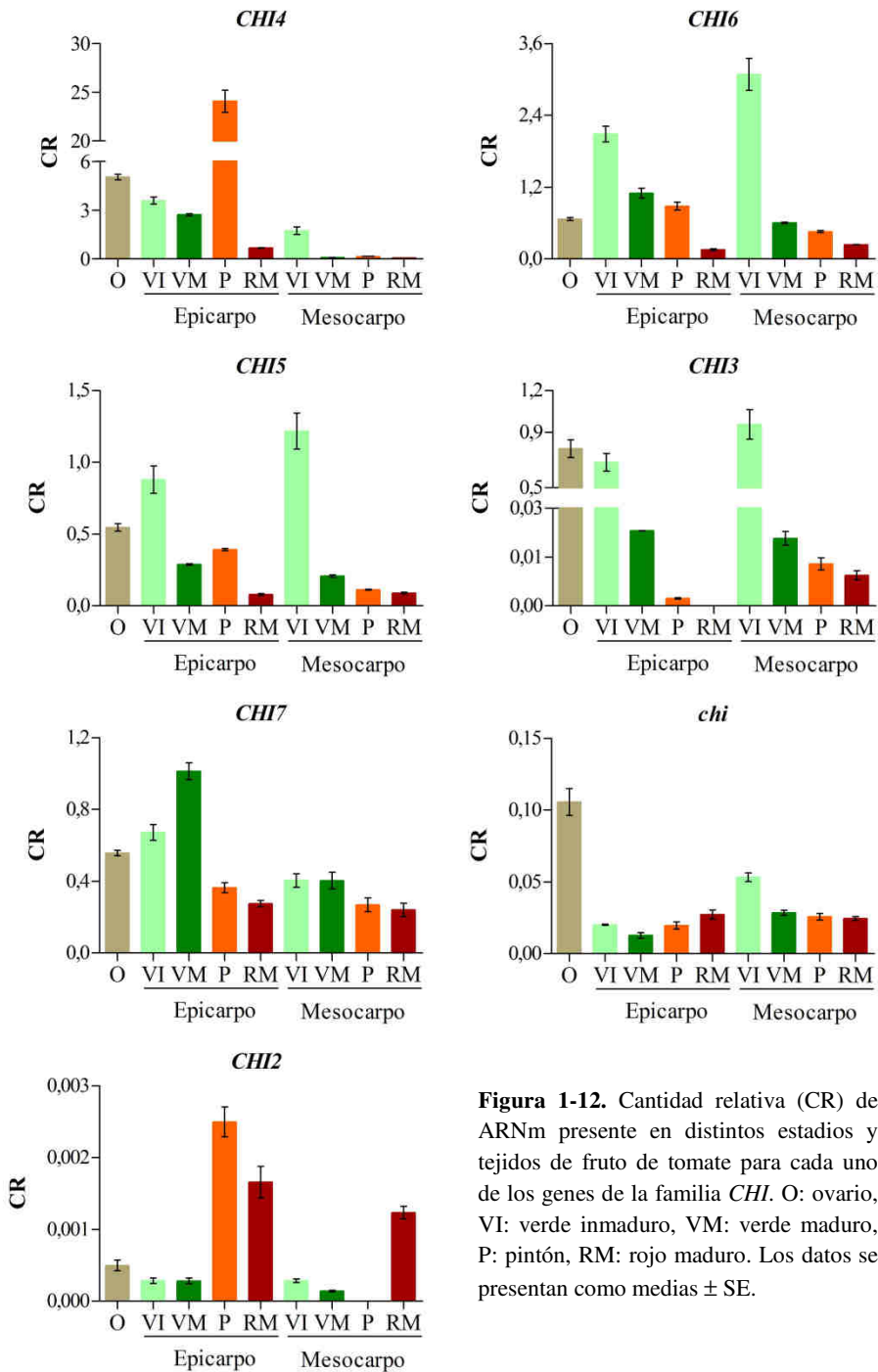
La Figura 1-11 muestra la expresión en fruto de los distintos miembros de la familia *CHS*. *CHS2* y *CHS1* presentaron expresión elevada en fruto mientras que el resto mostraron una expresión baja. *CHS3* por su parte no se expresó en ninguno de los tejidos o estadios de fruto. En general, todos los genes *CHS* fueron específicos de epicarpo mostrando nada de expresión o muy poca en el mesocarpo. La excepción fue *CHS4* que mostró expresión similar en epicarpo y mesocarpo. *CHS2* se expresó en todos los tejidos de epicarpo y en ovario y mostró dos máximos, uno pequeño en verde inmaduro y otro considerablemente mayor en pintón. El patrón de expresión de la *CHS1* fue similar, hubo expresión en ovario y en todos los tejidos del epicarpo y el máximo estuvo en el estadio pintón. A diferencia de *CHS2*, la expresión en ovario fue superior y similar a la observada en epicarpo verde inmaduro. *CHS6*, *CHS5*, *CHSA* y *CHS7* mostraron un aumento en la expresión durante la maduración alcanzando el máximo en rojo maduro. Con respecto a *CHS4* la expresión fue similar en epicarpo y mesocarpo durante el desarrollo y se alcanzó el máximo en el mesocarpo de rojo maduro.



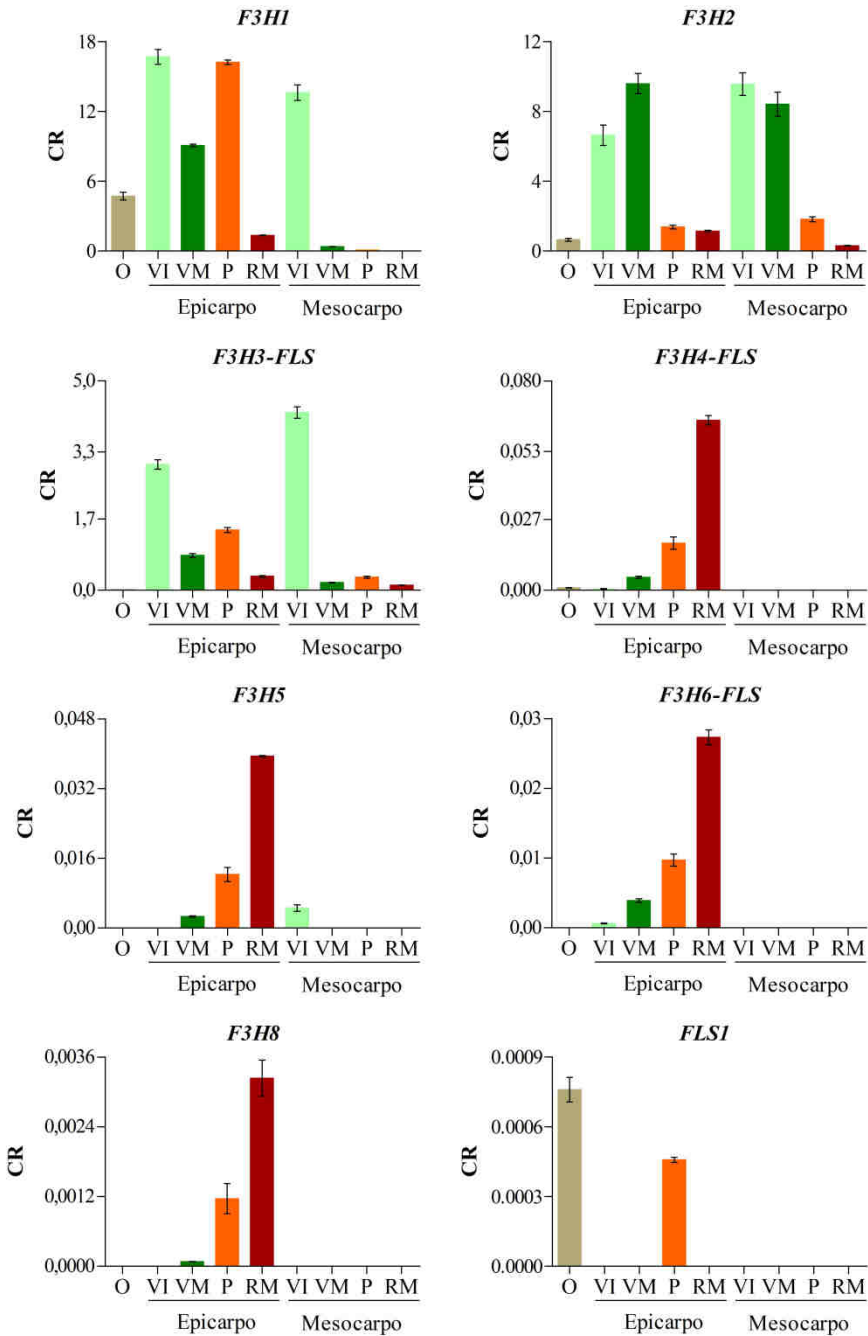
**Figura 1-11.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios y tejidos de fruto de tomate para cada uno de los genes de la familia *CHS*. O: ovario, VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.

En la Figura 1-12 se presentan la expresión en fruto de los diferentes miembros de la familia génica *CHI*. Al contrario de lo que se pudo observar con la familia *CHS*, los diferentes genes *CHI* mostraron expresión específica de estadio del desarrollo, pero no de tejido. La excepción fue *CHI4* que se expresó principalmente en el epicarpo y tuvo muy poca expresión en el mesocarpo. *CHI4* mostró una expresión similar en el ovario y en los estadios de verde inmaduro y verde maduro para luego alcanzar el máximo en pintón y posteriormente caer en rojo maduro. *CHI6*, *CHI5* y *CHI3* presentaron patrones de expresión similares con un máximo en verde inmaduro tanto en epicarpo como en mesocarpo y disminución en estadios posteriores del desarrollo. En el caso de *CHI3* la expresión en ovario fue similar a la de verde inmaduro. El gen *chi* presentó un máximo en ovario seguido de valores menores y similares a lo largo del desarrollo y maduración tanto a nivel de epicarpo como mesocarpo. *CHI7* también presentó un patrón de mayor expresión en epicarpo de estadios iniciales del desarrollo. Por último, *CHI2* mostró valores bastante bajos pero específicos de maduración con un máximo en pintón rojo maduro.

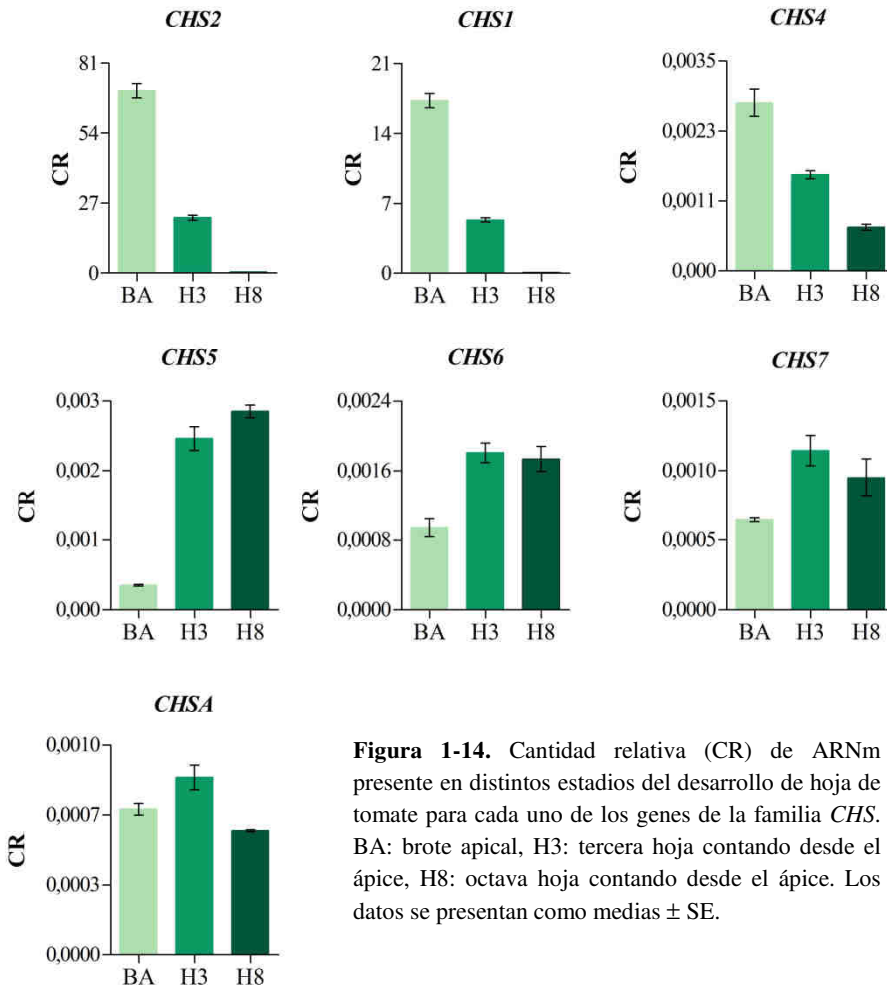
En el caso de las familias *F3H* y *FLS* se identificaron varios comportamientos (Figura 1-13). *F3H4-FLS*, *F3H5*, *F3H6-FLS* y *F3H8* fueron específicos de epicarpo y de maduración mostrando los mayores niveles de expresión en rojo maduro y con valores muy bajos a lo largo del desarrollo. Por su parte *F3H3-FLS* se expresó principalmente en verde inmaduro tanto en epicarpo como mesocarpo mientras que *F3H2* se expresó además en verde maduro. En ambos casos la expresión durante la maduración fue muy baja. *F3H1* mostró una expresión elevada en verde inmaduro tanto en el epicarpo como en el mesocarpo, pero en estadios más avanzados del desarrollo e inicio de la maduración esta expresión estuvo restringida al epicarpo. La expresión de *FLS1* fue muy baja y estuvo limitada al ovario y el epicarpo pintón. Finalmente, no se detectó amplificación en ninguno de los tejidos o estadios de fruto para *F3H7-FLS*.



**Figura 1-12.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios y tejidos de fruto de tomate para cada uno de los genes de la familia *CHI*. O: ovario, VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.



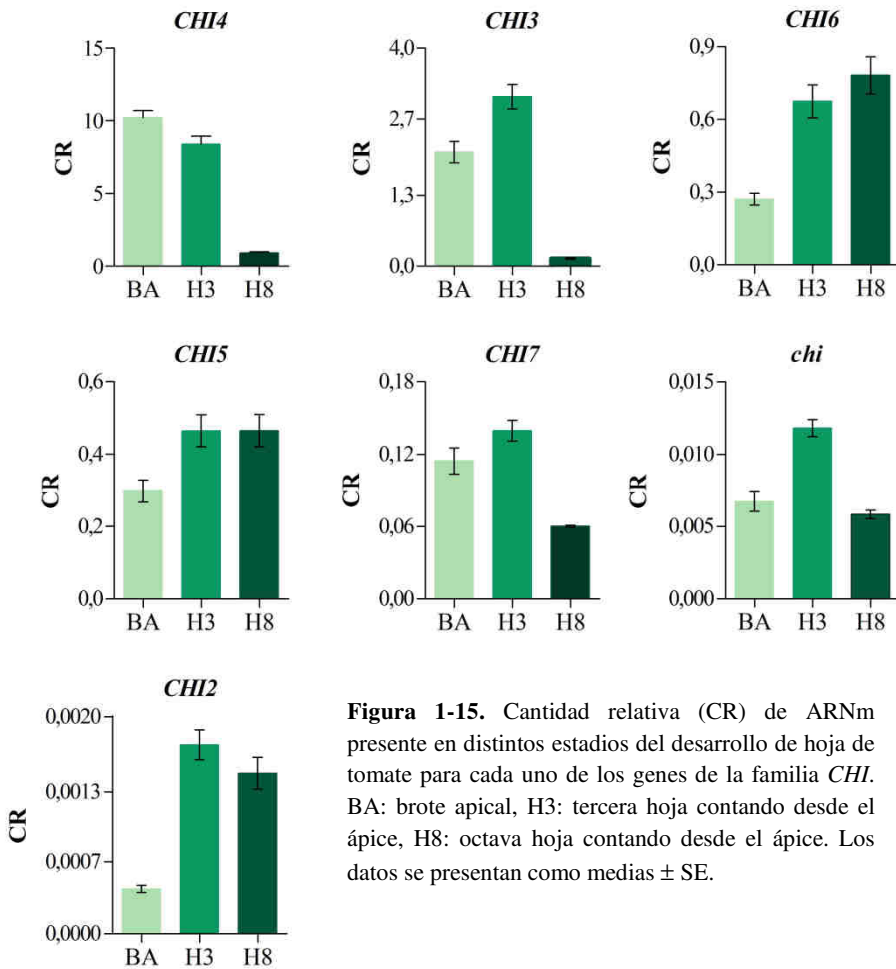
**Figura 1-13.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios y tejidos de fruto de tomate para cada uno de los genes de las familias *F3H* y *FLS*. O: ovario, VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.



**Figura 1-14.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de hoja de tomate para cada uno de los genes de la familia *CHS*. BA: brote apical, H3: tercera hoja contando desde el ápice, H8: octava hoja contando desde el ápice. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.

De modo general, los genes *CHS*, *CHI* y *F3H* que mostraron mayor expresión en fruto fueron los mismos que lo hicieron en hoja. La Figura 1-14 muestra la expresión de los miembros de la familia génica *CHS* en diferentes estadios del desarrollo de hoja. Como ya se ha mencionado con anterioridad, *CHS1* y *CHS2* presentaron valores considerablemente superiores al resto de los genes. Se identificaron varios patrones de expresión. Por un lado, *CHS1*, *CHS2* y *CHS4* mostraron mayor expresión en el brote apical y ésta disminuyó con la expansión y desarrollo de la hoja. Por otro, *CHS5*, *CHS6* y *CHS7* mostraron mayor expresión en los estadios de desarrollo y expansión foliar, hoja tercera y octava. Finalmente, la expresión de *CHSA* fue similar en los diferentes estadios. No se detectó expresión de *CHS3*.



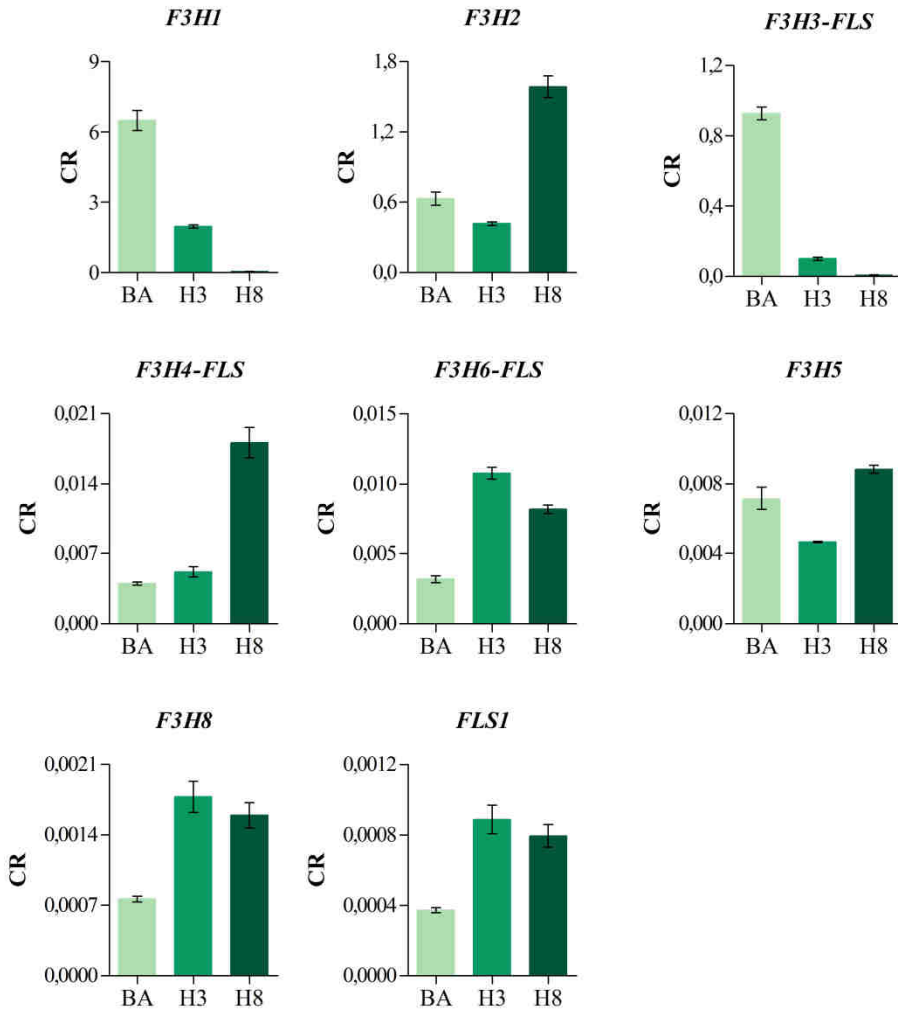


**Figura 1-15.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de hoja de tomate para cada uno de los genes de la familia *CHI*. BA: brote apical, H3: tercera hoja contando desde el ápice, H8: octava hoja contando desde el ápice. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.

La expresión en hoja de los diferentes genes que forman la familia *CHI* se muestra en la Figura 1-15. *CHI4*, *CHI3* y *CHI7* mostraron una expresión superior en los estadios iniciales del desarrollo foliar disminuyendo en la hoja octava. Por otro lado, *CHI6*, *CHI5* y *CHI2* mostraron un comportamiento contrario aumentando su expresión a lo largo del desarrollo. Por su parte *chi* presentó un máximo transitorio en la hoja tercera que disminuyó con la expansión foliar.

La expresión en hoja de los genes de las familias *F3H* y *FLS* se muestra en la Figura 1-16. De nuevo se identificaron diferentes patrones de expresión. *F3H1* y *F3H3-FLS* disminuyeron su expresión con el desarrollo hasta alcanzar un mínimo en la octava hoja. *F3H2*, *F3H4-FLS* y *F3H5* mostraron un nivel de expresión similar en los estadios iniciales del desarrollo y

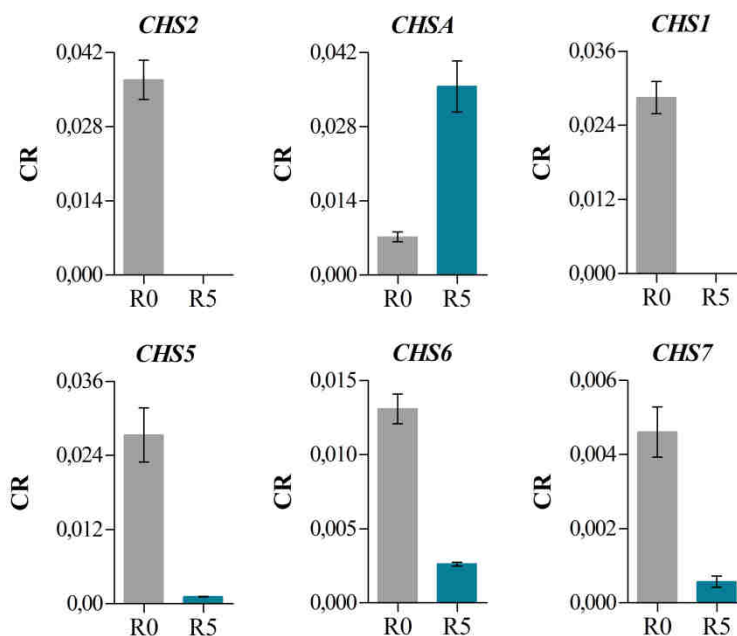
posteriormente aumentó en la hoja octava. Por su parte, *F3H6-FLS*, *F3H8* y *FLS1* aumentaron su expresión en la tercera hoja y la mantuvieron a lo largo del periodo de expansión foliar. No hubo expresión en hoja de *F3H7-FLS*.



**Figura 1-16.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de hoja de tomate para cada uno de los genes de las familias *F3H* y *FLS*. BA: brote apical, H3: tercera hoja contando desde el ápice, H8: octava hoja contando desde el ápice. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.

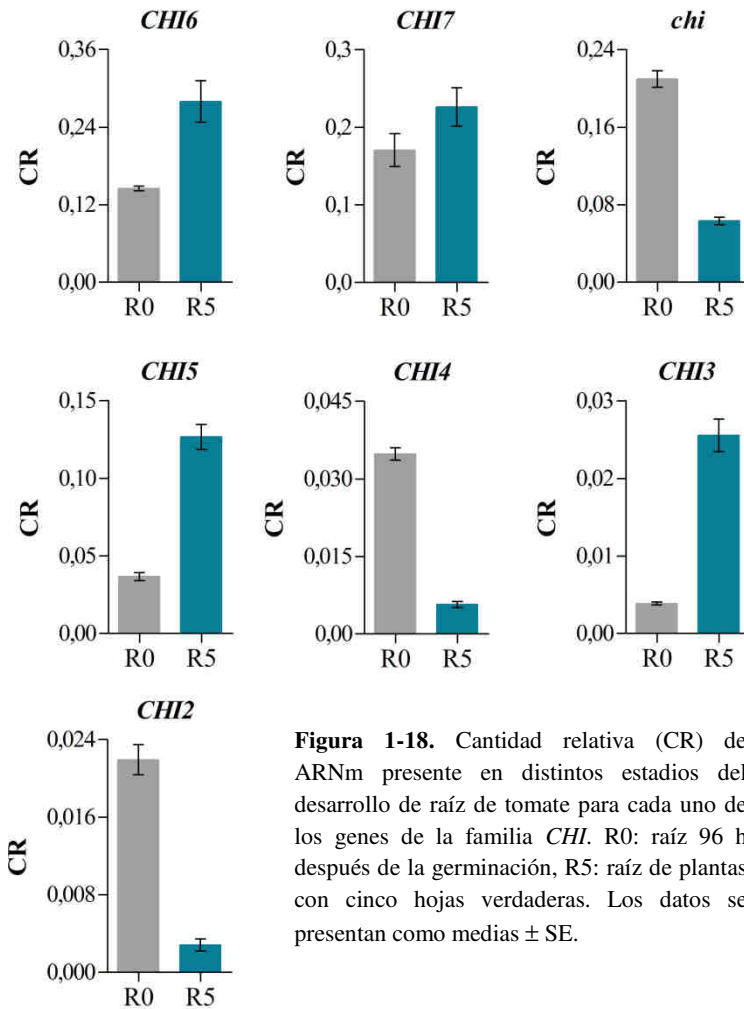
La Figura 1-17 muestra la expresión en raíz de los miembros de la familia *CHS*. Al contrario que en fruto y hoja donde la *CHS1* y *CHS2* se expresaron considerablemente más que el resto de las *CHS*, en raíz sus niveles de

expresión fueron similares a los de *CHSA* y *CHS5*. En la mayoría de los genes la expresión disminuyó al avanzar el desarrollo de la raíz, no detectándose en *CHS1* y *CHS2* expresión en la raíz de plantas con cinco hojas. La excepción fue *CHSA* cuya expresión aumentó con el desarrollo de la raíz. Los genes *CHS3* y *CHS4* no se expresaron en los tejidos de raíz estudiados.



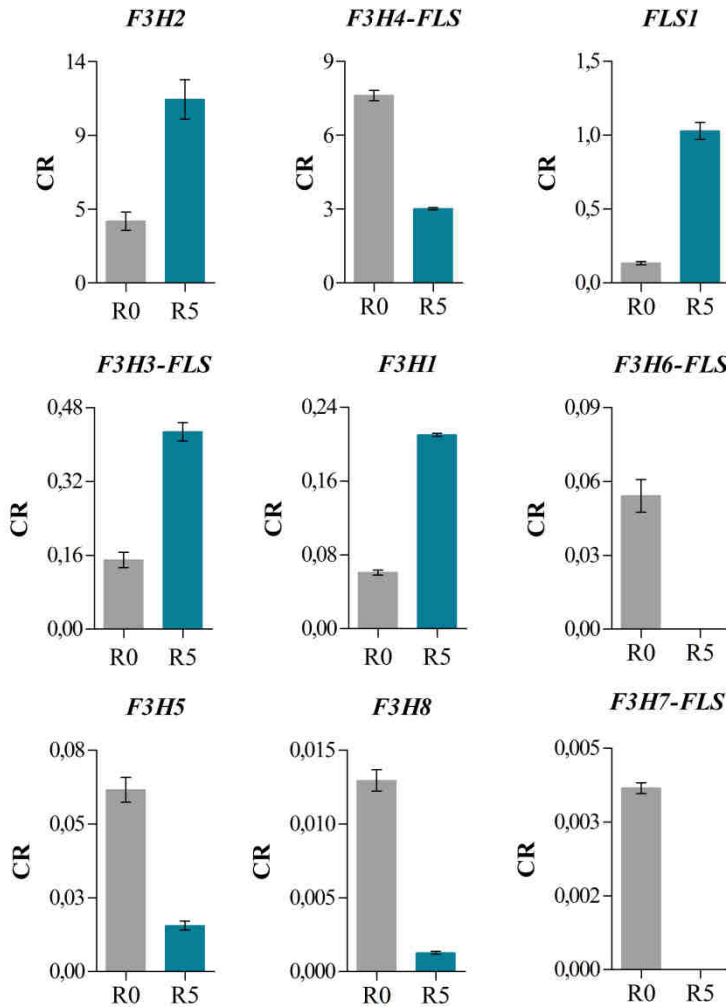
**Figura 1-17.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de raíz de tomate para cada uno de los genes de la familia *CHS*. R0: raíz 96 h después de la germinación, R5: raíz de plantas con cinco hojas verdaderas. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.

En la Figura 1-18 se presentan los datos de expresión en raíz de los genes de la familia *CHI*. Al contrario de lo observado con *CHS*, donde la mayoría de los genes disminuyó su expresión con del desarrollo de la raíz, en la familia *CHI* se observó aumento de expresión con el desarrollo en varios genes. Así, *CHI6*, *CHI5* y *CHI3* aumentaron su expresión en el estadio de raíz de plantas con cinco hojas. Por su parte, *chi*, *CHI4* y *CHI2* mostraron el comportamiento contrario, una disminución con el desarrollo, mientras que *CHI7* presentó valores de expresión similares en ambos estadios.



**Figura 1-18.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de raíz de tomate para cada uno de los genes de la familia *CHI*. R0: raíz 96 h después de la germinación, R5: raíz de plantas con cinco hojas verdaderas. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.

Finalmente, la expresión en raíz de los distintos genes *F3H* y *FLS* se muestra en la Figura 1-19. En este caso ocurrió como en la familia *CHI* algunos genes aumentaron su expresión con el desarrollo mientras otros disminuyeron. Así *F3H2*, *FLS1*, *F3H3-FLS* y *F3H1* aumentaron su expresión con el desarrollo mientras que *F3H4-FLS*, *F3H5* y *F3H8* mostraron el comportamiento opuesto a saber, una disminución con el desarrollo. Por otro lado, en *F3H6-FLS* y *F3H7-FLS* sólo se detectó expresión en el estadio de raíz de plántula 96 horas tras la germinación.



**Figura 1-19.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de raíz de tomate para cada uno de los genes de las familias *F3H* y *FLS*. R0: raíz 96 h después de la germinación, R5: raíz de plantas con cinco hojas verdaderas. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.

Adicionalmente, se aprovechó el conjunto de datos de qPCR para comparar el cálculo de las eficiencias de los cebadores empleando el programa LinReg con lo obtenido a partir de las rectas de calibrado. Los valores promedio obtenidos con el programa LinReg, a partir de la pendiente de la fase exponencial de la curva de amplificación, fueron bastante similares entre los distintos cebadores, oscilando entre 1,72 y 1,79. Así, los valores de

las eficiencias de los cebadores empleados en este trabajo fueron más homogéneos cuando se calcularon a partir de las curvas de amplificación que los que se obtuvieron a partir de las curvas de calibrado (valores comprendidos entre 1,88 y 2,01; Anexo I). Sin embargo, los valores de eficiencia que se obtuvieron a partir de las curvas de amplificación fueron inferiores a 1,8 que se considera el valor mínimo estándar (Remans *et al.*, 2014). Se considera que estos valores más bajos se pueden deber a una menor precisión del método (Hellemans *et al.*, 2007). No obstante, el cálculo de las eficiencias a partir de las curvas de amplificación permite estudiar la variabilidad que pueda existir entre muestras (Hellemans *et al.*, 2007). De este modo, se estudió también la variabilidad de la eficiencia entre tejidos y estadios dentro de un mismo tejido para cada gen obteniéndose un coeficiente de variación  $< 0,017$  en todos los casos. Estas diferencias entre estadios dentro de un mismo tejido no modificaron los patrones de expresión observados. En el Anexo IV se muestran los datos de expresión, calculados a partir de la eficiencia obtenida con el programa LinReg, para cada uno de los genes y tejidos estudiados. Como se puede observar, la principal diferencia con los datos de expresión con la recta de calibrado (Figuras 1-9 a 1-16) fue la cantidad relativa obtenida para cada gen. Teniendo en cuenta lo antes expuesto y que además las rectas de calibrado con cDNA, de acuerdo con lo sugerido por Remans *et al.* (2014), sólo se pueden hacer con aquellos genes y tejidos que tengan una expresión muy elevada, se decidió emplear en el resto de capítulos de la presente memoria el programa LinReg para el cálculo de las eficiencias de los cebadores.

## DISCUSIÓN

Los resultados de expresión presentados en esta memoria concordaron a grandes rasgos con la información presente en las bases de datos (ver Anexo V). Es necesario mencionar que en este trabajo el análisis de expresión se llevó a cabo con MM mientras que los referidos en las bases de datos se realizaron con ‘Ailsa Craig’, ‘M82’ y ‘Heinz 1706-BG’ y en cada caso se empleó un método distinto. Por otro lado, cada ensayo se realizó en un tejido o estadio diferente por lo que las comparaciones sólo pueden ser aproximadas. Sólo en dos casos se observaron discrepancias notables entre los resultados de las bases de datos y los obtenidos en esta memoria. El primero de ellos fue *CHS7* que apenas se expresó en ninguno de los tejidos estudiados y, sin embargo, de acuerdo con los datos en ‘Ailsa Craig’ se expresa en el epicarpo a 10dda. Por otro lado, *F3H7-FLS* sólo amplificó en tejidos de raíz y con una expresión muy baja. Sin embargo, de acuerdo con la información disponible en la base de datos se expresó diferencialmente en el mesocarpo de 10dda y en el pericarpo de fruto pintón de ‘Ailsa Craig’ si bien esto no se corroboró en ‘Heinz 1706-BG’ donde no se detectó en ninguno de los tejidos y estadios analizados (Anexo V).

El análisis de la familia CHS de tomate ha permitido identificar dos pseudogenes dispuestos en tándem en el genoma (*CHS5* y *CHS6*) que corresponden a los fragmentos C y N-terminal de una proteína CHS. Dada la función clave de la Cys del sitio catalítico de las PKS III (Lanz *et al.*, 1991; Jez *et al.*, 2000b) es improbable que ninguna de estas proteínas tenga función, ya que *CHS5* no tiene la Cys catalítica y *CHS6* sólo tiene la Cys pero no el resto de la proteína necesaria para la actividad catalítica. Esto coincidió con una expresión casi nula de ambos genes en todos los tejidos estudiados. Por su parte, *CHS3* y *CHS4* fueron las enzimas más alejadas de aquellas con función CHS conocida (*CHS1* y *CHS2*) (Schijlen *et al.*, 2007; España *et al.*, 2014b). Ambas enzimas mostraron proximidad filogenética con la proteína de maíz ASCL (Anther-specific CHS-like) (Han *et al.*, 2016). Las ASCL son un grupo de PKS III que se han identificado en varias especies vegetales y muestran similitud con algunas PKS III de microorganismos (Saxena *et al.*, 2003; Sankaranarayanan *et al.*, 2004; Mizuuchi *et al.*, 2008). Catalizan la condensación secuencial de varias moléculas de malonil-CoA con ácidos grasos de cadena larga para producir alquil  $\alpha$ -pironas (Mizuuchi *et al.*, 2008; Koduri *et al.*, 2010). En *A. thaliana* e *Hypericum perforatum* L. se

ha observado que los genes *ASCL* están involucrados en la síntesis de la esporopolenina (Dobritsa *et al.*, 2010; Jepson *et al.*, 2014). Sin embargo, la cantidad de flavonoides en las anteras de *less adhesive pollen 5 (lap5)* y *lap6*, mutaciones en los dos genes *ASCL* presentes en *A. thaliana*, estuvo significativamente reducida, lo que sugiere que estos genes participarían además en la síntesis o regulación de los flavonoides (Dobritsa *et al.*, 2010). Esto estaría de acuerdo con la falta de expresión de *CHS3* en fruto, hoja o raíz obtenida en el presente trabajo, así como con la expresión de *CHS3* en botones florales registrada en la base de datos (<http://ted.bti.cornell.edu/>; Tomato Genome Consortium, 2012; Chakrabarti *et al.*, 2013). No obstante, este no fue el caso para *CHS4* ya que sí se detectó expresión, aunque baja, en algunos tejidos de fruto y hoja. En *A. thaliana* e *H. perforatum* también se ha observado expresión de alguno de los genes *ASCL* en tejidos distintos de la antera (Karppinen y Hohtola, 2008; Kim *et al.*, 2010) lo que indica que algunos de estos genes podrían tener funciones adicionales a la síntesis de esporopolenina en otros tejidos. La modificación de la expresión de uno de estos genes *ASCL* en hojas de *H. perforatum* en respuesta a herida, ácido abscísico y ácido jasmónico apunta en este sentido (Jepson *et al.*, 2014).

Igualmente, la proximidad de *CHSA* con *CHSB* de *P. hybrida* y otros genes *CHS* de *I. purpurea* sugiere que esta enzima tampoco tiene función *CHS* (Clegg y Durbin, 2000). El estudio filogenético de las PKS III llevado a cabo por Abe y Morita (2010) incluyó a las enzimas *PhCHSB*, *IpCHSA* e *IpCHSB* en el grupo de las PKS III sin actividad *CHS*. Por el contrario, mostraron mayor similitud con un grupo de poliquétido sintasas de *Aloe arborescens* Mill. (Abe y Morita, 2010). Estas enzimas, entre las que se incluye la pentaquétido cromona sintasa y la octaquétido sintasa, son responsables de la condensación de varias moléculas de malonil-CoA entre sí, aunque también son capaces de sintetizar, en menor medida, estilbenos y chalconas hexaquétidos (Abe *et al.*, 2005a,b; Shi *et al.*, 2009). La expresión de *CHSA* estuvo principalmente restringida a la raíz de plantas en desarrollo, coincidiendo con lo registrado en la base de datos para ‘Heinz 1706-BG’ (Tomato Genome Consortium, 2012). Por su parte, en petunia sólo se ha detectado expresión de *CHSB* en semillas en respuesta a luz UV (Koes *et al.*, 1989b; Koes *et al.*, 1990) mientras que en *I. purpurea* hubo expresión de *CHSA*, *CHSB* y *CHSC* en tejidos de la flor pero no en hojas o raíces (Durbin *et al.*, 2000). Por lo tanto, al contrario que las *ASCL*, no parece que haya una



acumulación preferente en un tipo de tejido de los poliquétidos aromáticos posiblemente sintetizados por estas enzimas.

CHS7 es la única proteína, al margen de CHS1 y CHS2, que aparentemente se agrupa con las PKS III con función CHS (Abe y Morita, 2010). Su expresión fue muy baja en todos los tejidos y estadios estudiados por lo que es posible que se exprese en otros tejidos o sólo se exprese en respuesta a algún tipo de estrés biótico o abiótico, como ocurre en algunas especies (Koes *et al.*, 1989b; Fiorani *et al.*, 2005; Dao *et al.*, 2011). En tomate se ha detectado expresión de CHS7 en el estilo de flores sin polinizar (López-Casado *et al.*, 2012). Tampoco se puede descartar la posibilidad de que el mecanismo de ciclación empleado por CHS7 difiera de la CHS. La ESTILBENO SINTASA (STS) es la enzima responsable de la síntesis de estilbenos. STS y CHS emplean los mismos precursores y el mismo mecanismo de condensación pero difieren en la reacción de ciclación empleada (Ferrer *et al.*, 1999). Ambas enzimas comparten una elevada identidad aminoacídica, sin embargo, se ha detectado variabilidad en los aminoácidos de dos láminas  $\beta$  que recubren el bolsillo de ciclación y que podrían estar involucrados en los diferentes mecanismos de ciclación empleados por cada una de ellas (Ferrer *et al.*, 1999). Precisamente, en esta misma región se ha observado varias sustituciones en los aminoácidos responsables del bolsillo de ciclación de la CHS7 (ver Figura 1-2).

El mutante de tomate *anthocyanin free (af)* se caracteriza por carecer de antocianos en los tejidos vegetativos (Burdick, 1958). La reciente identificación del gen responsable de esta mutación ha permitido determinar que se trata de un gen *CHI*, cuya actividad ha sido demostrada indirectamente al revertir la mutación tras la aplicación exógena de naringenina (Kang *et al.*, 2014). Concretamente, el gen responsable de *Af* se corresponde con *CHI3* en esta memoria. De los siete genes *CHI* presentes en tomate, dos de ellos *CHI2* y *CHI3* fueron los más parecidos a las *CHIs* canónicas (Jez *et al.*, 2000b) y presentaron además los aminoácidos que se postulan responsables de la preferencia por la chalconaringenina como sustrato. Se trata por tanto de *CHIs* pertenecientes al tipo I. *CHI3* se expresó en estadios iniciales del desarrollo de frutos y hojas, mostrando una expresión baja en raíz de planta en desarrollo. Por su parte, *CHI2* apenas se expresó en los tejidos estudiados aunque sí mostró expresión en los botones florales de 'Heinz 1706-BG' (Tomato Genome Consortium, 2012). Esto está de acuerdo con lo descrito en

la bibliografía referente a la expresión de *CHI2* y *CHI3* en hoja (Kang *et al.*, 2014).

Por su parte, *CHI5*, *CHI6*, *CHI7* y *chi* mostraron mayor similitud con las proteínas CHI pertenecientes al tipo III, que se corresponde con FAPs (Ngaki *et al.*, 2012; Dastmalchi y Dhaubhadel, 2015). Las FAPs se dividen en tres grupos, perteneciendo *CHI5* y *chi* al grupo FAP1, *CHI7* al FAP2 y *CHI6* al FAP3 (Ngaki *et al.*, 2012; Dastmalchi y Dhaubhadel, 2015). Se desconoce la actividad precisa de estos enzimas, aunque se ha mostrado que en *A. thaliana* FAP1 interaccionó preferentemente con ácidos grasos saturados mientras que FAP3 posiblemente se une a ácidos grasos C<sub>16</sub> ó C<sub>18</sub> insaturados (Ngaki *et al.*, 2012). La expresión de *FAP1* y *FAP3* estuvo restringida a tejidos reproductivos y a tejidos en estadios iniciales del desarrollo tanto en *A. thaliana* como en soja mientras que, en *A. thaliana*, *FAP2* se expresó a lo largo del desarrollo de la planta (Ngaki *et al.*, 2012; Dastmalchi y Dhaubhadel, 2015). En tomate, *CHI5*, *CHI6*, *CHI7* y *chi* se expresaron principalmente en tejidos jóvenes, aunque hubo expresión a lo largo de todo el desarrollo. *chi* está descrito como uno de los varios genes del metabolismo de los flavonoides regulado por *ANT1*, un factor de transcripción tipo MYB que favorece la acumulación de antocianos (Mathews *et al.*, 2003). Sin embargo, su caracterización como posible proteína involucrada en el metabolismo de los ácidos grasos hace necesario replantearse su función.

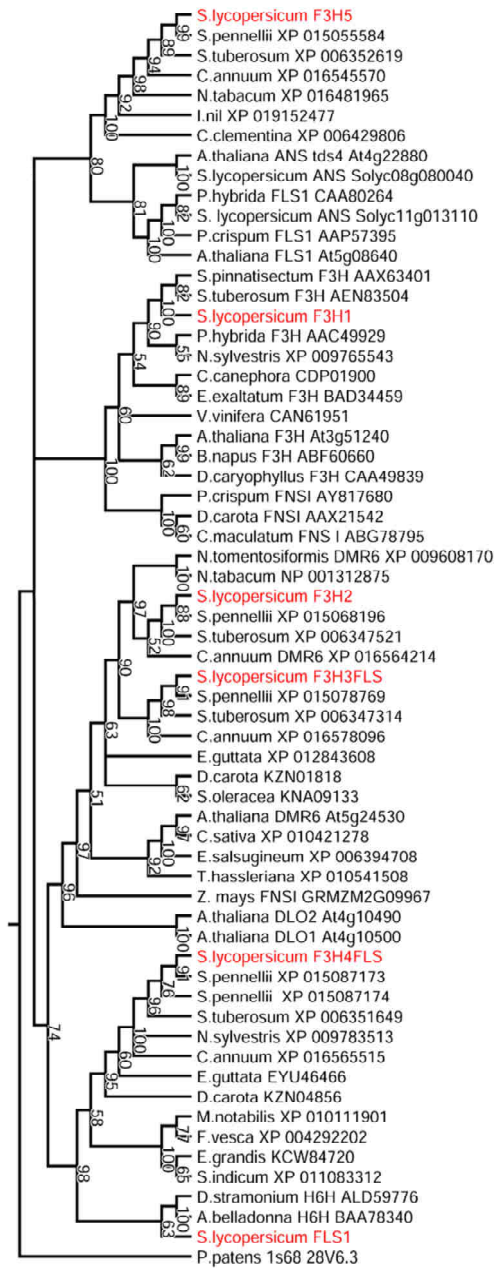
*CHI4* pertenece al tipo IV de proteínas CHI también denominado CHI-like (Ngaki *et al.*, 2012; Dastmalchi y Dhaubhadel, 2015). Se ha demostrado que algunas de estas enzimas están involucradas en la síntesis de flavonoides, si bien su actividad enzimática no ha sido descrita (Morita *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2015). Varias de estas *CHI* tipo VI co-expresan con otros genes del metabolismo de los flavonoides como *CHI* y *CHS* y se inducen por luz UV (Wolf *et al.*, 2010; Morita *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2015). En *A. thaliana* se ha observado que CHI-like interacciona físicamente con CHI postulándose la posibilidad de que formen un heterodímero (Jiang *et al.*, 2015). Así, CHI-like actuaría como un potenciador de la actividad CHI, careciendo ella misma de actividad catalítica (Morita *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2015). Las diferencias de peso molecular observadas entre proteínas CHI purificadas de distintas especies, plantea la posibilidad de que éstas puedan formar dímeros (Bednar y Hadcock, 1988; Jiang *et al.*, 2015). Adicionalmente, se ha identificado una región de la proteína CHI que podría estar involucrada en la dimerización

(Gensheimer y Mushegian, 2004). Los resultados de expresión presentados en esta memoria mostraron una expresión coordinada de *CHI4* con *CHI2* en raíz y con *CHI3* en hoja, las dos únicas *CHIs* de tomate que, aparentemente, tienen función chalcona isomerasa. Sin embargo, la elevada expresión de *CHI4* observada en epicarpo pintón no estuvo acompañada de una expresión significativa de *CHI3* ó *CHI2*. Esto plantea la posibilidad de que esta *CHI4* pueda funcionar también como potenciador de otros enzimas de la ruta de los flavonoides como *CHS*, de acuerdo con lo sugerido por Morita *et al.* (2010), o que sea capaz de interactuar con las *CHI* tipo III.

La caracterización de la familia F3H-FLS de tomate permitió la identificación de tres miembros, *F3H6-FLS*, *F3H7-FLS* y *F3H8*, que codifican para fragmentos N- y C-terminales, respectivamente y que apenas se expresaron en los tejidos estudiados. Los otros seis miembros sí codificaron proteínas completas con los motivos de unión a Fe(II) y 2-oxoglutarato característicos de esta familia (Hegg y Que, 1997; Clifton *et al.*, 2006). La mutación *anthocyanin reduced (are)* de tomate se caracteriza por una reducción de antocianos (Yoder *et al.*, 1994). Recientemente se ha demostrado que el gen responsable de esta mutación es *F3H1* (Maloney *et al.*, 2014). Sin embargo, la falta de actividad F3H detectada en este mutante no explica su capacidad de sintetizar pequeñas cantidades de antocianos (Yoder *et al.*, 1994). Se ha postulado la posibilidad de que otro miembro de la familia F3H-FLS pudiera llevar a cabo su función, de manera análoga a lo observado *in vitro* en *A. thaliana* (Turnbull *et al.*, 2004; Owens *et al.*, 2008; Maloney *et al.*, 2014). No obstante, tal y como ha quedado reflejado en los resultados, la conservación de secuencia aminoacídica dentro de esta familia es bastante baja y teniendo en cuenta la gran diversidad de funciones y reacciones que pueden llevar a cabo las enzimas dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe(II), y que se desconoce la actividad metabólica de muchas de ellas, es difícil especular al respecto. F3H2 y F3H3-FLS formaron un clado con la proteína de *A. thaliana* DOWNY MILDEW RESISTANT 6 (DMR6), la cual participa en la resistencia a varios patógenos mediada por el ácido salicílico (van Damme *et al.*, 2008; Zeilmaker *et al.*, 2015), por lo que es posible que estas dos enzimas estén también involucradas en mecanismos de defensa. Recientemente, se ha demostrado que esta enzima DMR6 de *A. thaliana*, al igual que su homóloga en maíz, tiene función FLAVONA SINTASA I (FNSI) mostrando por un lado que la enzima FNSI no está restringida a la familia *Apiaceae* (Gebhardt *et al.*, 2007) y por otro

postulando un papel de las flavonas en la resistencia a patógenos mediada por hormonas (Falcone-Ferreira *et al.*, 2015). F3H4-FLS y FLS1 agruparon con enzimas de función desconocida siendo HIOSCIAMINA 6-HYDROLASA (H6H) la única con función conocida. Esta enzima participa en la síntesis de alcaloides catalizando la conversión de hiosciamina en escopolamina (Hashimoto *et al.*, 1991; Matsuda *et al.*, 1991). La familia de las *Solanaceae* se caracteriza por la acumulación de glicoalcaloides en diversos tejidos como fruto, hoja y raíz (Nagaoka *et al.*, 1993; Yahara *et al.*, 1996; Friedman, 2002). Dado que la expresión de estas dos enzimas de tomate estuvo principalmente restringida a la raíz, es posible que ambas enzimas esten involucradas en la síntesis de alcaloides en dicho tejido.

La proteína F3H5 se localizó en una rama distinta dentro del clado que incluyó a las proteínas con función ANS (ANTOCIANINA SINTASA) y FLS conocida. Sin embargo, esta enzima de tomate apenas se expresó en ninguno de los tejidos estudiados, lo que parece indicar que se trata de una enzima que, bien se expresa en otros tejidos que no se han estudiado en esta memoria, o bien su expresión está inducida. Al tratarse de la única enzima estudiada que agrupó con las FLS de función conocida, se planteó la cuestión de cuál es la enzima responsable de la acumulación de flavonoles en fruto y hoja de tomate (Stewart *et al.*, 2001; Slimestad y Verheul, 2009). Dada la proximidad filogenética observada entre las enzimas ANS y FLS (Figura 1-10) se identificaron las enzimas anotadas como ANS en el genoma del tomate y se estudió su proximidad filogenética con el resto de los miembros de la familia F3H y FLS. Así, se identificaron dos genes que agruparon específicamente con las proteínas de función conocida ANS y FLS, respectivamente (Figura 1-20). Una búsqueda más exhaustiva en el genoma de tomate con la secuencia FLS de *A. thaliana* no permitió identificar ningún gen adicional. Todo esto parece indicar que el gen FLS se corresponde con Solyc11g013110.



**Figura 1-20.** Árbol filogenético de F3H y FLS de varias especies de plantas. Se empleó la proteína 1s68 28V6.3 de *P. patens* como *outgroup*. Análisis realizado con el método de parsimonia. Los números indican los valores del análisis de *bootstrap*. En rojo, las proteínas F3H y FLS de tomate.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## CAPÍTULO 2

# INTERACCIÓN ENTRE LAS RUTAS DE SÍNTESIS DE FLAVONOIDEOS Y DE CUTÍCULA

*"La ciencia se compone de errores, que,  
a su vez, son los pasos hacia la verdad"*

*Julio Verne*





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## INTRODUCCIÓN

Los flavonoides son moléculas que conforman una amplia familia de compuestos implicados en diversos procesos del desarrollo de las plantas como ya se vio en la *Introducción general*. Recordemos que además de intervenir en el crecimiento y desarrollo de las plantas, dichos compuestos ejercen un papel importante en la dieta, debido a sus propiedades antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias, analgésicas, antitrombóticas, antioxidantes o anticancerosas, entre otras (Mo *et al.*, 1992; van der Meer *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 2001; Winkel-Shirley, 2001; Muir *et al.*, 2001; Bovy *et al.*, 2002; Graf *et al.*, 2005; Tattini *et al.*, 2005; Riederer y Müller, 2006; Peer y Murphy, 2007; Besseau *et al.*, 2007; Laffont *et al.*, 2010; Maloney y Muday, 2011).

Con el fin de mejorar las propiedades nutricionales del fruto de tomate se han llevado a cabo diversas estrategias para modificar tanto la cantidad como el perfil de flavonoides acumulados (Muir *et al.*, 2001; Winkel-Shirley, 2001; Bovy *et al.*, 2002; Giovinanza *et al.*, 2005; Schijlen *et al.*, 2006; Bovy *et al.*, 2007; Butelli *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2008; Ingrosso *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). La expresión de los factores de transcripción *ROSEA1 (ROSI)* y *DELILA (DEL)* procedentes de *Antirrhinum majus* L. en frutos de tomate han demostrado que la acumulación de flavonoles y antocianos en dichos frutos (Butelli *et al.*, 2008) lleva asociado un aumento de la vida poscosecha (Zhang *et al.*, 2013). Además, frutos que acumulan antocianos, como los frutos *Del/Ros1* o los frutos *Aft* y *at/Aft atv/atv* producidos por introgresión de *Solanum chilense* y *Solanum cheesmaniae* (Povero *et al.*, 2011), mostraron un retraso en la maduración y una reducción en la susceptibilidad a *Botrytis cinerea* (Bassolino *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015). Estos cambios pueden estar relacionados con la acumulación de antocianinas, que aumenta la capacidad antioxidante total de los tomates, disminuyendo la acumulación de ROS, y retrasando así la sobremaduración del fruto y reduciendo su susceptibilidad a este patógeno necrotrófico (Zhang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015) o bien pueden relacionarse con la variación en la cantidad de ceras acumuladas en las cutículas de los frutos (España *et al.*, 2014b). Por otro lado, en tomate se ha visto que los flavonoides afectan a otros parámetros del fruto relacionados con la cutícula como son el agrietado y el micro-agrietado. Estudios realizados en frutos que presentaban una reducción significativa de la cantidad de flavonoides en la cutícula debido al

tapado de los frutos o por silenciamiento génico, mostraron que la menor cantidad de flavonoides estaba relacionada con un aumento en el índice y la severidad del agrietado y del micro-agrietado (España *et al.*, 2012).

Ballester *et al.* (2010) propusieron que CHI es la enzima limitante de la acumulación de flavonoides en el fruto de tomate basándose en los resultados obtenidos de la determinación de los niveles de expresión de *CHS* y *CHI* durante la maduración (Bovy *et al.*, 2002; Ballester *et al.*, 2010; España *et al.*, 2014b). Concretamente la sobreexpresión de un gen *CHI* de petunia (*PhCHI*) en tomate conllevó la acumulación masiva de flavonoles en la piel de frutos maduros destacando principalmente rutina, quercetina y kaempferol (Muir *et al.*, 2001). La sobreexpresión del gen *CHI* de petunia junto con un gen *FNS* de gerbera (*PhCHI/GhFNS*) conllevó un aumento en los niveles de flavonas (principalmente luteolina) y de flavonoles, y una disminución de los niveles de chalconaringenina en la piel del fruto de tomate con respecto a los observados en los frutos que sobreexpresaban únicamente el gen de petunia, indicando que la sobreexpresión conjunta de los dos genes desplazó la ruta hacia las flavonas y los flavonoles, lo cual estaría determinado por el sustrato disponible para la enzima CHI (Schijlen *et al.*, 2006). Todo ello hace que tanto las plantas de tomate que sobreexpresan en el gen *PhCHI* como las que expresan dicho gen de petunia junto con el gen de gerbera *FNS* sea un buen material para estudiar la interacción entre las rutas de síntesis de flavonoides y de la cutícula.

A pesar de la complejidad de la ruta de síntesis de los fenoles, estos compuestos (en cuanto a cantidad se refiere) conforman un componente minoritario en la cutícula del fruto. La proporción de flavonoides, en el caso de la cutícula del fruto de tomate, depende principalmente del estadio de desarrollo del mismo, alcanzándose el máximo de acumulación en el fruto maduro (España *et al.*, 2014a). Junto con los fenoles, la cutícula está compuesta por ceras, polisacáridos y cutina (siendo estos dos últimos los componentes principales). Se ha comprobado que la reducción en la cantidad de flavonoides afecta a la cantidad total de cutícula y de los demás componentes (España *et al.*, 2014b). Dada la naturaleza heterogénea de esta membrana, son muchos los genes que se han identificado como parte de la ruta de síntesis de la misma, así como del control hormonal y su deposición (Knoche y Peschel, 2007b; Curvers *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2010; L'Haridon *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Por otro lado, la cantidad de cutícula, y de

sus componentes, que se deposita está regulada por las condiciones ambientales, así como su morfología (grosor y grado de invaginación) (Hull *et al.*, 1975; López-Casado, 2006; Kosma *et al.*, 2009; Domínguez *et al.*, 2008; 2012). Por todo ello la cutícula presenta una regulación compleja con un gran número de genes implicados en la misma como ya se vio en el apartado de *Introducción general*.

La ruta de síntesis de flavonoides está regulada, al igual que ocurre con los demás componentes de la cutícula, por factores de transcripción (TFs). Los principales factores de transcripción que intervienen en la regulación de la síntesis de flavonoides se pueden clasificar en tres grandes familias: ERFs, MYB y HD-Zip IV (Aharoni *et al.*, 2004; Broun *et al.*, 2004; Cominelli *et al.*, 2008; Javelle *et al.*, 2010; Kannangara *et al.*, 2007; Seo *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2005). Entre los numerosos factores de transcripción identificados hasta la fecha y que están relacionados con la ruta de los flavonoides, hay algunos que están involucrados también en otros procesos biológicos de la planta, como APETALA2 (AP2) miembro de la familia ERFs implicado en la maduración del fruto de tomate y la síntesis y deposición de componentes de la cutícula (Karlova *et al.*, 2011). La familia AP2/ERF es una de las más amplias de factores de transcripción en plantas (Licausi *et al.*, 2013). Dentro de la misma encontramos al primer factor de transcripción descrito en *A. thaliana* como regulador de la síntesis y deposición de ceras, WIN1/SHN1 (Aharoni *et al.*, 2004; Broun *et al.*, 2004). El genoma de *A. thaliana* contiene 3 genes homólogos, *SHN1*, *SHN2* y *SHN3*, que codifican para tres factores de transcripción con distintos niveles de similitud. *SHN1* y *SHN2* tienen un 55% de identidad, mientras que *SHN2* y *SHN3* presentan un mayor nivel de homología, conservando un 71% de identidad (Aharoni *et al.*, 2004). *SHN1* se expresa principalmente en raíces y flores, aunque también pueden observarse niveles bajos en otros órganos de la planta. El gen *SHN2* de *A. thaliana* se expresa en la antera y en los tejidos de la silicua, mientras que *SHN3* es ubicuo, expresándose en todos los órganos de la planta. La fuerte expresión de genes *SHN* en flores se correlaciona con un contenido relativamente alto de ceras en estos órganos. Los genes *SHN* actúan en la regulación de la elongación de las células epidérmicas en los órganos florales, particularmente en los pétalos. La reducción en los niveles de expresión de estos genes conducen a la fusión de órganos florales y se acompañan de una disminución en la cantidad de cutina (Shi *et al.*, 2011). *CUTIN DEFICIENT2 (CD2)* es un gen que codifica para un factor de

transcripción del tipo HD-Zip IV (*homeodomain-leucine zipper class IV*) que regula la biosíntesis de cutina y por tanto su expresión afecta a la arquitectura y propiedades mecánicas de la cutícula (Isaacson *et al.*, 2009, Nadakuduti *et al.*, 2012; Giménez *et al.*, 2015). La caracterización del mutante de tomate *sticky peel (pe)* y su posterior mapeo genético reveló que se trataba de un alelo de *CD2*. Entre otras características, este mutante es deficiente en cutina, presenta alterado el perfil de las ceras, tiene mayor permeabilidad cuticular, menor acumulación de antocianos y menor densidad de tricomas (Isaacson *et al.*, 2009; Swathi *et al.*, 2012).

Los factores de transcripción MYB están implicados en una gran variedad de procesos biológicos de plantas, incluyendo el metabolismo secundario, la determinación de la forma celular, la diferenciación celular, la biosíntesis y deposición de la cutícula y responden ante diferentes tipos de estreses (Lippold *et al.*, 2009). En tomate, se ha descrito la participación de MYB12 en la regulación de la ruta de biosíntesis de flavonoides y su deficiencia, como en el caso del mutante *colorless fruit epidermis*, da lugar a frutos de color rosa, ya que su cutícula no acumula flavonoides (Adato *et al.*, 2009; Ballester *et al.*, 2010). La transcripción de *MYB30* se induce en respuesta a la infección por patógenos bacterianos, como *Xanthomonas campestris pv campestris*, activando genes responsables de la síntesis de ceras, principalmente las intracuticulares (Raffaele *et al.*, 2008). MYB96 fue identificado como un factor de transcripción que media la tolerancia frente a la sequía y es inducible por ABA y auxinas (Seo *et al.*, 2009). Estudios de sobreexpresión de *MYB96* en *A. thaliana* revelaron que provoca cambios en el crecimiento de raíces laterales, activa genes responsables de la síntesis de ceras epicuticulares de hojas (Seo *et al.*, 2011) e induce cambios en el desarrollo de la epidermis de hojas, particularmente en el número y tamaño de estomas (Aharoni *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007). Mientras que MYB96 es un regulador positivo de la producción de ceras como respuesta a un estrés, MYB41 actúa como regulador negativo de la biosíntesis de cutina frente a un estrés similar. *MYB41* presenta unos niveles bajos de expresión en ausencia de estrés mientras que cuando aparece un estrés osmótico, de sequía o ABA, *MYB41* es inducido y ejerce su función (Cornielli *et al.*, 2008). Estudios llevados a cabo en *A. thaliana*, mediante la sobreexpresión de este factor de transcripción, muestran cómo se induce una disminución en el tamaño celular, llegando a presentar enanismo. Además, se produce una discontinuidad en la cutícula, lo cual hace que se incremente la permeabilidad

a través de la superficie de la hoja y por lo tanto las plantas son más sensibles a la desecación (Cornielli *et al.*, 2008).

Dentro de la ruta de síntesis de flavonoides cabe destacar el importante papel de varias enzimas, particularmente la FENILALANINA AMONIO LIASA (PAL), primera de la ruta de síntesis de los fenilpropanoides y que constituye la unión entre el metabolismo primario y el secundario. En tomate, estas enzimas pertenecen a una familia de al menos 18 genes dispersos por todo el genoma, regulados por un efectivo e inusual sistema de silenciamiento, en el que un solo gen controla la expresión de la PAL para que ésta realice su función en respuesta a estímulos ambientales (Chang *et al.*, 2008). En el caso de la CHS, primera enzima de la ruta de los flavonoides, su importancia viene dada por el control que ejerce sobre la síntesis y acumulación de muchos de los compuestos fenólicos. De los 8 genes *CHS* identificados en tomate (<https://solgenomics.net/>) se sabe que *CHS1* y *CHS2* se expresan durante la maduración del fruto, presentando ambos un nivel de expresión mayor en el estadio pintón, si bien *CHS2* presenta niveles más altos de expresión que *CHS1* durante toda la maduración (España *et al.*, 2014). La expresión de *CHS* durante la maduración controla los diferentes cambios que se dan en las células epidérmicas y en la cutícula durante este periodo. Afecta a la deposición de los diferentes componentes de la cutícula, así como a la disposición molecular en la matriz de cutina, además de provocar cambios en la forma celular (España *et al.*, 2014). La expresión de *CHS* también parece estar relacionada con la formación y la capacidad de germinación del polen. En estudios llevados a cabo en nuestro grupo donde se analizaron plantas de tomate transgénicas que tienen silenciado el gen *CHS* a nivel de planta completa, se observó partenocarpia asociada a defectos en el polen. Varias investigaciones sugieren que CHI puede ser una enzima reguladora de la síntesis de pigmentos flavonoides e isoflavonoides. Esta enzima es fuertemente inhibida por los flavonoles quercetina y kaempferol, y por los isoflavonoides kievitona y coumestrol (Dixon *et al.*, 1982), mientras que su actividad puede ser inducida por el ácido cinámico, intermediario en la vía de los fenilpropanoides (Gerrish *et al.*, 1985). Mutaciones del gen *CHI* provocan cambios en el color de diferentes partes de la planta. En aster de China (*Callistephus chinensis*) y en clavel (*Dianthus cayophyllus*) aparecen los pétalos de las flores de color amarillo; en *A. thaliana* vira el color de la

cubierta de la semilla (Forkmann y Heller, 1999) y en tomate la cutícula del fruto carece de coloración (Muir *et al.*, 2001).

Otra rama de la ruta de los flavonoides consiste en la síntesis de flavonas a partir de flavanonas por medio de una reacción llevada a cabo por la enzima FLAVONA SINTASA (FNS). Al menos hay dos proteínas diferentes responsables de esta conversión oxidativa: FNS I y FNS II. FNS I es propia de la familia Apiaceae, fue descrita por primera vez en perejil (*Petroselinum crispum*) y clasificada como dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato (Sutter *et al.*, 1975; Britsch *et al.*, 1981). FNS II es una enzima perteneciente a la superfamilia de proteínas citocromo P450, concretamente a la subfamilia CYP93B y clasificada como dependiente de NADPH. Está presente en muchos de los tejidos de la mayoría de plantas, tanto superiores como inferiores, como por ejemplo *Antirrhinum majus* (planta donde fue demostrada por primera vez su actividad, (Stotz y Forkmann, 1981), *Glycine max*, *Callistephus chinensis* o *Gerbera hybrida*, sin embargo, en tomate no hay identificados a día de hoy genes *FNS*.

Las proteínas lipasas/hidrolasas con motivo GDSL (en adelante proteínas o genes GDSL) pertenecen a la familia de las hidrolasas  $\alpha/\beta$  y muchas de ellas se expresan en células epidérmicas, cerca de las membranas cuticulares (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005; Reina *et al.*, 2007; Mintz-Oron *et al.*, 2008; Matas *et al.*, 2010; Yeats *et al.*, 2010; Girard *et al.*, 2012). Se ha destacado el papel de estas enzimas en la tolerancia de las plantas frente a estreses de tipo biótico y abiótico (Oh *et al.*, 2005, Naranjo *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2008), y en la exportación extracelular (Girard *et al.*, 2012). En tomate, el mutante *cd1* fue descrito en 2009 y presentaba una reducción en la cantidad de cutina de los frutos del 95% (Isaacson *et al.*, 2009). Posteriormente, el silenciamiento mediante ARNi del gen *GDSL2* conllevó una alteración en la cantidad y estructura de la cutina en el fruto de tomate similar a la de *cd1* (Girard *et al.*, 2012). Recientemente, se ha descrito que *CD1* y *GDSL2* son el mismo gen (Solyc11g006250) y a la proteína que codifica, una GDSL, se la ha denominado CUTIN SINTASA 1 (Yeats *et al.*, 2014). Se ha visto que esta enzima es también requerida para la deposición de cutina en el exocarpo del fruto de tomate teniendo un papel importante en la polimerización de la cutina (Domínguez *et al.*, 2015; Philippe *et al.*, 2015). Otro gen relacionado con la biosíntesis de la cutícula o deposición de la cutina para la formación de la cutícula y cuya proteína posee dominios  $\alpha/\beta$  hidrolasa es *BODYGUARD*

(Kurdyukov *et al.*, 2006; Domínguez *et al.*, 2015). El mutante *bdg* de *A. thaliana* presenta una capa cuticular discontinua provocando un aumento en la permeabilidad cuticular y fusión de órganos. Aunque BDG actúa como una sintasa, la pérdida de función en el mutante llevó consigo, paradójicamente, un aumento de la cantidad de cutícula y de ceras (Kurdyukov *et al.*, 2006). Trabajos de silenciamiento de un gen ortólogo de *BDG* en tomate llevados a cabo en nuestro laboratorio, han permitido comprobar que tanto el silenciamiento transitorio (VIGS) como el estable (transgénicas) del gen *SIBDG* provoca alteraciones a nivel epidérmico conducentes a plantas con mayor permeabilidad cuticular (Reina-Pinto, datos no publicados).

Otros genes que están relacionados con la elongación de ácidos grasos y el metabolismo de las ceras son *CER6* y *CER1-like*. *CER6* (previamente anotado como *LeCER6*) es un gen de tomate homólogo del gen *CER6* de *A. thaliana* que codifica una  $\beta$ -cetoacil-CoA sintasa implicada en la síntesis de ceras cuticulares durante el desarrollo del fruto, concretamente en la elongación de ácidos grasos de cadena muy larga (los denominados VLCFA) (Vogg *et al.*, 2004; Leide *et al.*, 2007; Mintz-Oron *et al.*, 2008). La mutación del gen *CER6* mostró una variación en la composición de las ceras cuticulares y en la permeabilidad cuticular (Mintz-Oron *et al.*, 2008).

Estudios en los que se identificó a genes de tomate ortólogos de *AtSHN*, mostraron que *SHN3* estaba altamente expresado en el exocarpo de frutos en el estadio verde maduro de manera similar a otros genes relacionados con el metabolismo de la cutícula (Mintz-Oron *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2012). El silenciamiento de *SHN3* en tomate provocó fenotipos asociados a la cutícula con cambios importantes en la epidermis. *SHN3* regula tanto genes asociados con el metabolismo de la cutina como genes reguladores de la expresión. Parece ser que un gen que está regulado por *SHN3* es *SICYP86A69*, citocromo P450 homólogo putativo de una proteína relacionada con la biosíntesis de cutina de *A. thaliana* implicada en la hidroxilación de ácidos grasos. Su mutación provoca deficiencia en cutina y esto conlleva cambios en la respuesta del fruto a estreses bióticos o abióticos (Shi *et al.*, 2012). *CYP86A68* es otro gen perteneciente a la familia citocromo P450 con función en la hidroxilación terminal de los ácidos grasos (Lashbrooke *et al.*, 2015).

ABCG32/PDR4/PEC1 es miembro de la familia de transportadores del tipo ABC. En *A. thaliana* los transportadores PDR tienen un amplio patrón de

expresión, lo cual indica que están involucrados en diferentes procesos biológicos (Martinoia *et al.*, 2002; Bessire *et al.*, 2011). Se conoce que ABCG32 es un transportador que se requiere para la formación de la cutícula al igual que ocurre con otros miembros de esta familia como es el caso de ABCG11, transportador implicado en la exportación de monómeros de cutina (Bird *et al.*, 2007, Luk *et al.*, 2007, Panikashvili y otros, 2007, Ukitsu *et al.*, 2007; Bessire *et al.*, 2011). Los mutantes de silenciamiento de ABCG32/PECL (*pec1*) mostraron una disminución en ácidos grasos oxigenados saturados mientras que los niveles de ácidos no sustituidos o ácidos dicarboxílicos insaturados en las cutículas no se vieron afectados (Bessire *et al.*, 2011). Estudios realizados en el mutante *pec1* revelaron la importancia de este gen en la cutícula de la hoja durante la expansión de la roseta en *A. thaliana*. La reducción de monómeros C16 en dicho mutante durante este periodo afectó a la permeabilidad de la cutícula (Bessire *et al.*, 2011; Fabre *et al.*, 2015).



## RESULTADOS

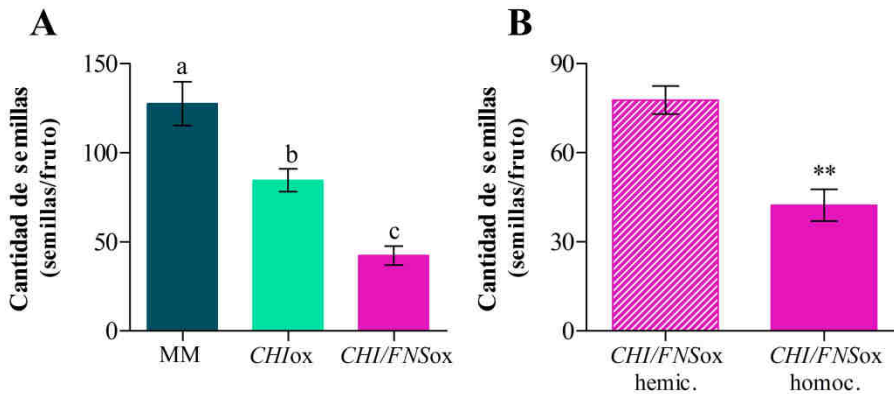
### I. Crecimiento y desarrollo del fruto

La evolución del tamaño del fruto a lo largo del crecimiento y maduración se presenta en la Tabla 2-1. Las plantas *CHIOx* mostraron diferencias significativas en el tamaño del ovario, siendo éste menor que los ovarios de las plantas MM y *CHI/FNSox*. Si bien esta diferencia se perdió en estadios posteriores, sí se observó una diferencia clara de tamaño de fruto durante la maduración. Así, los frutos de las plantas *CHIOx* y *CHI/FNSox* fueron menores que los del control MM. Adicionalmente se estudió la evolución temporal del desarrollo. En este sentido, se pudo observar que la mayoría de los frutos de las plantas *CHIOx* y *CHI/FNSox* alcanzaron el estadio rojo maduro antes que el control MM, no observándose diferencias entre ellas.

**Tabla 2-1.** Evolución del diámetro del fruto (mm) a lo largo del desarrollo en frutos procedentes de plantas de MM control y plantas homocigotas *CHIOx* y *CHI/FNSox*. O: ovario, VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada estadio ( $p \leq 0,05$ ).

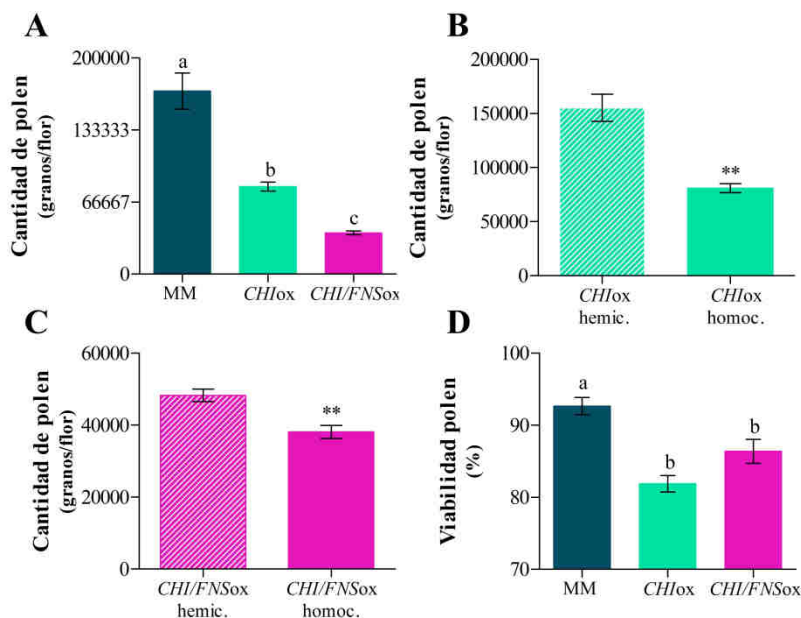
Estadio	MM	<i>CHIOx</i>	<i>CHI/FNSox</i>
O	1,70 $\pm$ 0,03 a	1,59 $\pm$ 0,03 b	1,76 $\pm$ 0,03 a
VI	30,28 $\pm$ 0,43 a	31,27 $\pm$ 0,53 a	30,44 $\pm$ 0,41 a
VM	50,46 $\pm$ 0,49 a	50,91 $\pm$ 0,59 a	47,85 $\pm$ 0,19 b
P	55,77 $\pm$ 0,29 a	52,28 $\pm$ 0,35 b	51,99 $\pm$ 0,25 b
RM	59,77 $\pm$ 0,37 a	54,63 $\pm$ 0,38 b	54,93 $\pm$ 0,47 b

La figura 2-1 muestra la cantidad de semillas por fruto que presentaron las plantas en este estudio. Se observó una diferencia notable en cuanto a la cantidad de semillas de los frutos de las plantas homocigotas *CHIOx* y *CHI/FNSox* con respecto al control MM (Figura 2-1A). Las plantas hemicigotas de *CHI/FNSox* produjeron un número de semillas igual (~80 semillas por fruto) a las plantas *CHIOx* (tanto en hemicigosis como en homocigosis). Los frutos de las plantas homocigotas *CHI/FNSox* fueron los que presentaron un menor número de semillas con una media de aproximadamente 42 semillas por fruto. Estas diferencias se mantuvieron en las plantas de la temporada de invierno (datos no mostrados).



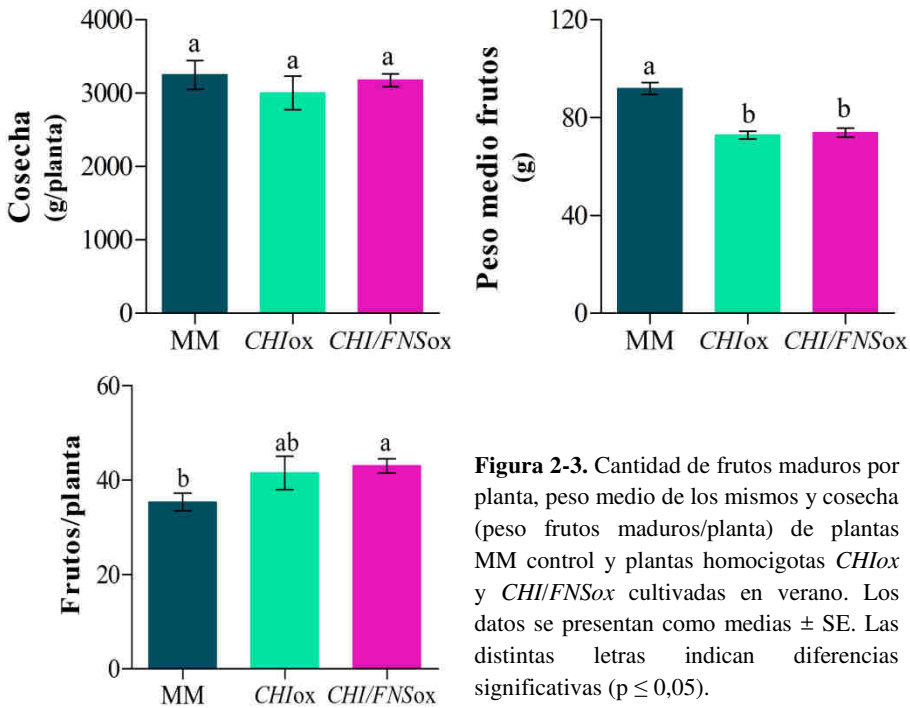
**Figura 2-1.** A, cantidad de semillas por fruto de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIox* y *CHI/FNSox*. B, cantidad de semillas por fruto en las plantas *CHI/FNSox* hemicigotas y homocigotas. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) mientras que los dos asteriscos diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ).

La Figura 2-2 muestra la cantidad y viabilidad del polen, observándose diferencias significativas entre las plantas modificadas genéticamente y su control. Las plantas MM control presentaron una cantidad de polen de aproximadamente 160000 granos/flor. Dicha cantidad se vio reducida en aproximadamente el 50% en el caso de las plantas *CHIox* homocigotas y el 77% en el caso de las plantas *CHI/FNSox* homocigotas (Figura 2-2A). Las plantas homocigotas presentaron una menor cantidad de polen con respecto a sus hemicigotas (Figuras 2-2B y C), siendo dicha reducción mayor en el caso de las plantas *CHIox* (Figuras 2-2B). Las plantas *CHIox* hemicigotas presentaron una cantidad de polen por flor similar a las plantas control. La viabilidad del polen también se vio reducida en las plantas modificadas genéticamente con respecto al control MM en torno a un 6-11%. En este caso no se observaron diferencias significativas entre las plantas hemicigotas y homocigotas. En cuanto al tamaño y la superficie de los granos de polen estudiados mediante MEB tampoco se observaron diferencias entre los distintos genotipos.



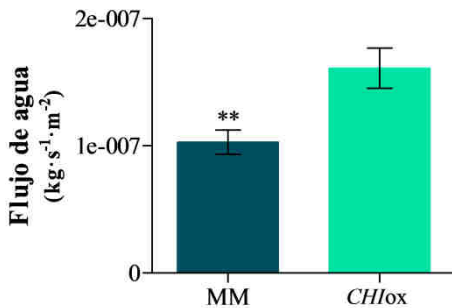
**Figura 2-2.** **A**, cantidad de polen por flor de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIOx* y *CHI/FNSox*. **B**, cantidad de polen por flor en las plantas *CHIOx* hemicigotas y homocigotas. **C**, cantidad de polen por flor en las plantas *CHI/FNSox* hemicigotas y homocigotas. **D**, viabilidad del polen de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIOx* y *CHI/FNSox*. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) mientras que los dos asteriscos diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ).

La sobreexpresión de los genes *PhCHI* y *PhCHI/GhFNS* afectó a la cantidad y al peso medio de los frutos maduros de las plantas genéticamente modificadas, tanto en las hemicigotas como en las homocigotas, con respecto a las plantas MM control (Figura 2-3), siendo las plantas *CHI/FNSox* las que presentaron un mayor número de frutos maduros seguidas de las plantas *CHIOx*. Las plantas MM control fueron las que presentaron un menor número de frutos, mientras que, *CHIOx* y *CHI/FNSox* fueron las que presentaron los frutos más pequeños (peso en gramos). Estas diferencias en cuanto a número de frutos por planta y peso de los frutos en los diferentes genotipos, hicieron que finalmente todos presentasen una cosecha (medida en gramos por planta) similar.



**Figura 2-3.** Cantidad de frutos maduros por planta, peso medio de los mismos y cosecha (peso frutos maduros/planta) de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIOx* y *CHI/FNSox* cultivadas en verano. Los datos se presentan como medias ± SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

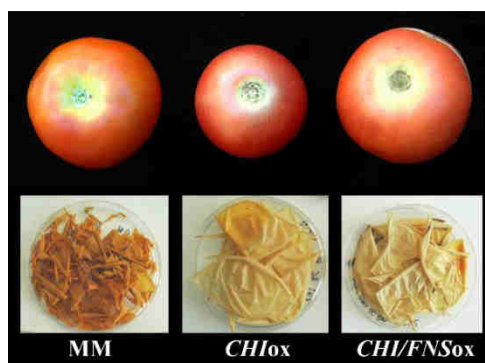
La Figura 2-4 muestra la vida poscosecha de frutos MM control y frutos de plantas *CHIOx* homocigotas. Los frutos de las plantas *CHI/FNSox* no se evaluaron debido al alto índice de agrietado que presentaron, no pudiendo obtener un número adecuado de frutos sin agrietar para realizar dicho estudio. Entre los dos genotipos estudiados se observaron diferencias significativas, siendo el flujo de agua en las plantas transgénicas mayor que en las plantas control.



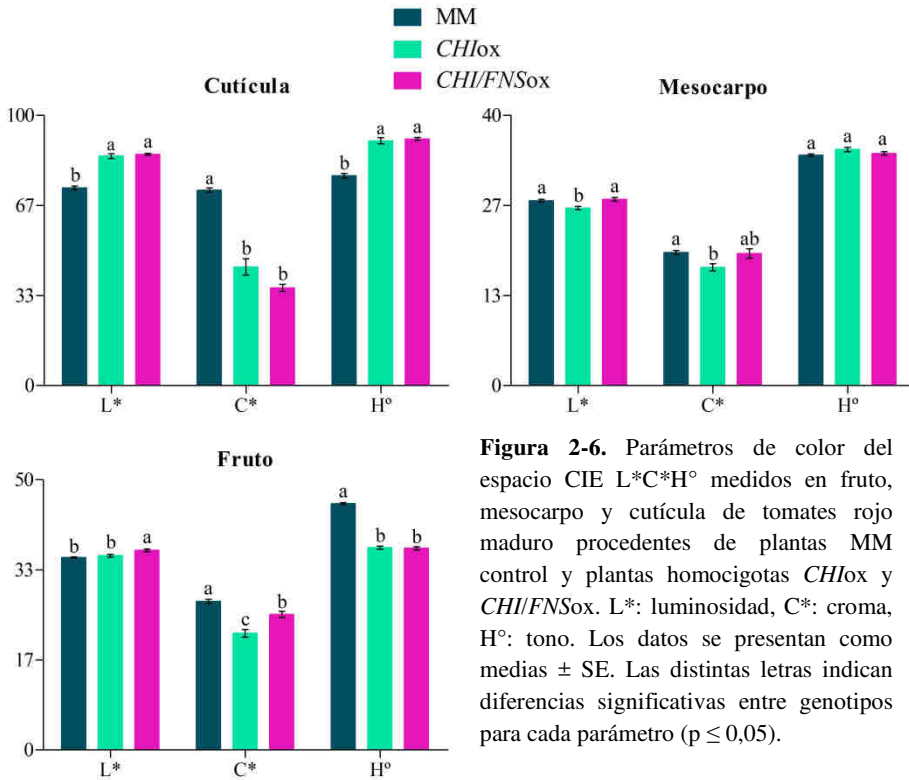
**Figura 2-4.** Transpiración, expresada como flujo de agua, de frutos rojo maduro durante la poscosecha. Frutos procedentes de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIOx*. Los datos se presentan como medias ± SE. Los dos asteriscos indican diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ).

## II. Calidad de fruto

Las diferencias en cuanto a color se apreciaron a simple vista tanto en frutos maduros como en las cutículas aisladas (Figura 2-5). El color se determinó en las cutículas aisladas, en el mesocarpo y en los frutos maduros (Figura 2-6). Las determinaciones de color realizadas en la cutícula aislada mostraron diferencias en los valores de  $L^*$ ,  $C^*$  y  $H^\circ$  con la sobreexpresión tanto del gen *PhCHI* como con la sobreexpresión de este gen junto con el gen *GhFNS*, presentando en ambos casos valores más altos de  $L^*$  y  $H^\circ$  y valores más bajos de  $C^*$  con respecto al control. En el caso del mesocarpo aislado, el color varió tanto en  $L^*$  como en  $C^*$  en los frutos *CHIOx*, donde dichos parámetros se vieron reducidos respecto a MM control y *CHI/FNSox*, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el tono ( $H^\circ$ ) del mesocarpo entre los diferentes genotipos. El color de los frutos completos mostró diferencias significativas entre los distintos genotipos en los valores de  $L^*$ ,  $C^*$  y  $H^\circ$ . Así, el valor de  $L^*$  aumentó con la sobreexpresión conjunta de los genes *PhCHI* y *GhFNS* mientras que los valores de  $C^*$  y  $H^\circ$  disminuyeron en los frutos de las plantas transgénicas (tanto *CHIOx* como *CHI/FNSox*) con respecto a los del control.

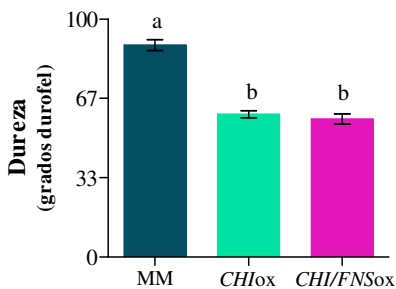


**Figura 2-5.** Frutos maduros MM, *CHIOx* y *CHI/FNSox* homocigotos en la fila superior. Cutículas aisladas de los frutos en la fila inferior.



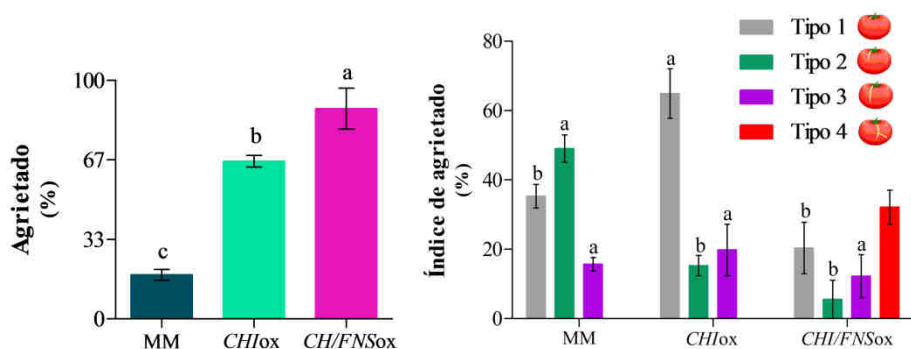
**Figura 2-6.** Parámetros de color del espacio CIE L\*C\*H° medidos en fruto, mesocarpio y cutícula de tomates rojo maduro procedentes de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIox* y *CHI/FNSox*. L\*: luminosidad, C\*: croma, H°: tono. Los datos se presentan como medias ± SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre genotipos para cada parámetro ( $p \leq 0,05$ ).

La sobreexpresión de los genes *PhCHI* y *PhCHI/GhFNS* afectó a la dureza de los frutos de manera que, en ambos casos, dicha dureza se vio reducida. Los frutos de las plantas MM control presentaron una dureza de 89 grados Durofel mientras que los frutos de las plantas *CHIox* y *CHI/FNSox* presentaron unos valores de 60 y 58 grados Durofel respectivamente (Figura 2-7).



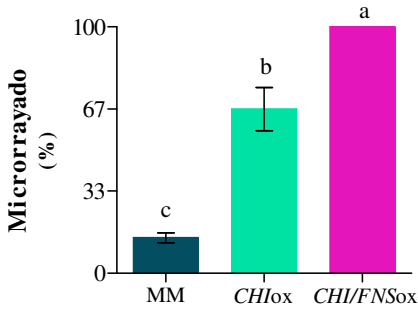
**Figura 2-7.** Dureza de los frutos rojo maduro de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIox* y *CHI/FNSox*. Los datos se presentan como medias ± SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

La modificación de la ruta de biosíntesis de los flavonoides también afectó a la calidad externa del fruto en cuanto al agrietado del mismo (Figura 2-8), de tal modo que la sobreexpresión del gen *PhCHI* provocó un aumento de la cantidad de frutos que presentaron agrietado en torno a un 30% aproximadamente mientras que la sobreexpresión conjunta de los genes *PhCHI* y *GhFNS* produjo un aumento en torno al 70% comparado con el control. Además de presentar un mayor porcentaje de frutos agrietados, las plantas *CHI/FNSox* mostraron un agrietado más severo, presentando frutos con agrietado de tipo 4 en la escala utilizada para evaluar dicha severidad. Por el contrario, la mayor parte de los frutos de las plantas *CHIOx* y del control MM (~84-88%) presentaron una severidad de tipo 1 y 2.



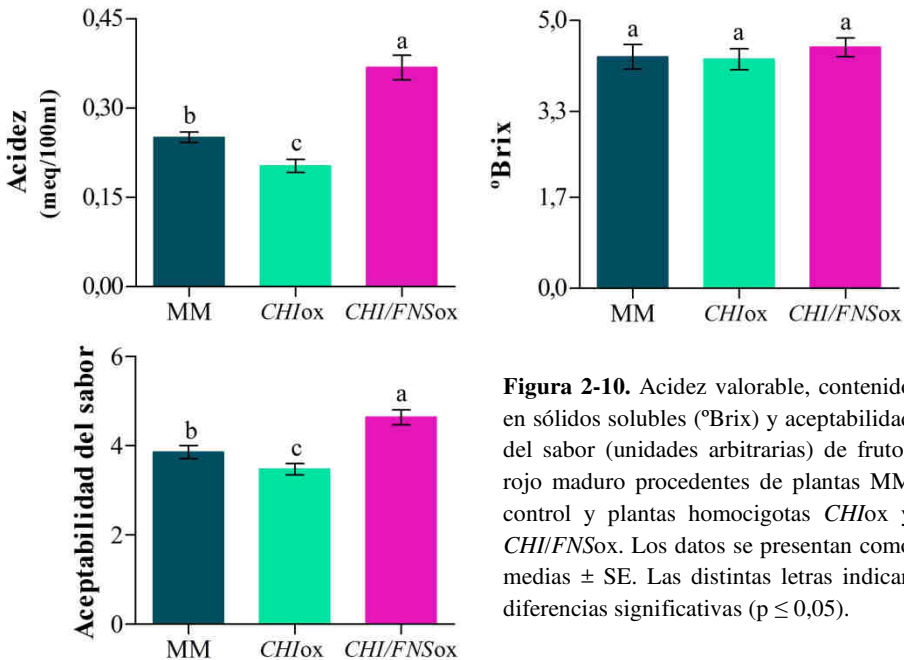
**Figura 2-8.** Porcentaje de agrietado total e índice de agrietado de frutos rojo maduro procedentes de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIOx* y *CHI/FNSox*. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada tipo de agrietado ( $p \leq 0,05$ ).

Al igual que ya ocurriese con el agrietado, la modificación genética de la ruta provocó un aumento del porcentaje de frutos que presentaron microrrayado. Así la sobreexpresión del gen *PhCHI* aumentó la aparición de microrrayado en un 50% con respecto al control, mientras que todos los frutos de las plantas *CHI/FNSox* presentaron microrrayado (Figura 2-9).



**Figura 2-9.** Porcentaje de microrrayado presente en frutos rojo maduro procedentes de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIox* y *CHI/FNSox*. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

En cuanto a la calidad interna del fruto, la sobreexpresión de los genes *PhCHI* y *PhCHI/GhFNS* no afectó al contenido en sólidos solubles, pero por el contrario, sí afectó a la acidez y a la aceptabilidad del sabor (Figura 2-10). En estos parámetros los frutos de las plantas *CHI/FNSox* presentaron valores significativamente superiores, seguidos de los frutos de las plantas MM control. Por último, los valores significativamente más bajos en acidez y aceptabilidad del sabor correspondieron a los frutos de las plantas que sobreexpresan el gen *PhCHI*.



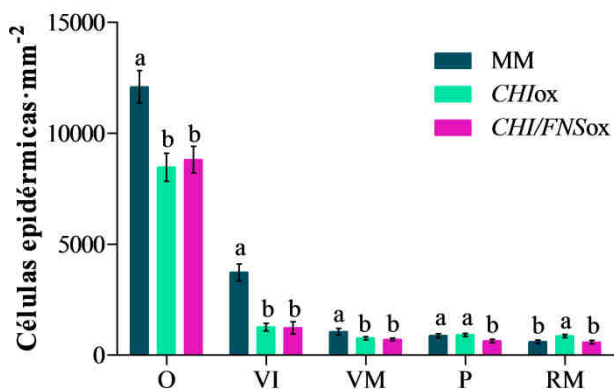
**Figura 2-10.** Acidez valorable, contenido en sólidos solubles (°Brix) y aceptabilidad del sabor (unidades arbitrarias) de frutos rojo maduro procedentes de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIox* y *CHI/FNSox*. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).



### III. Desarrollo de la epidermis y cutícula

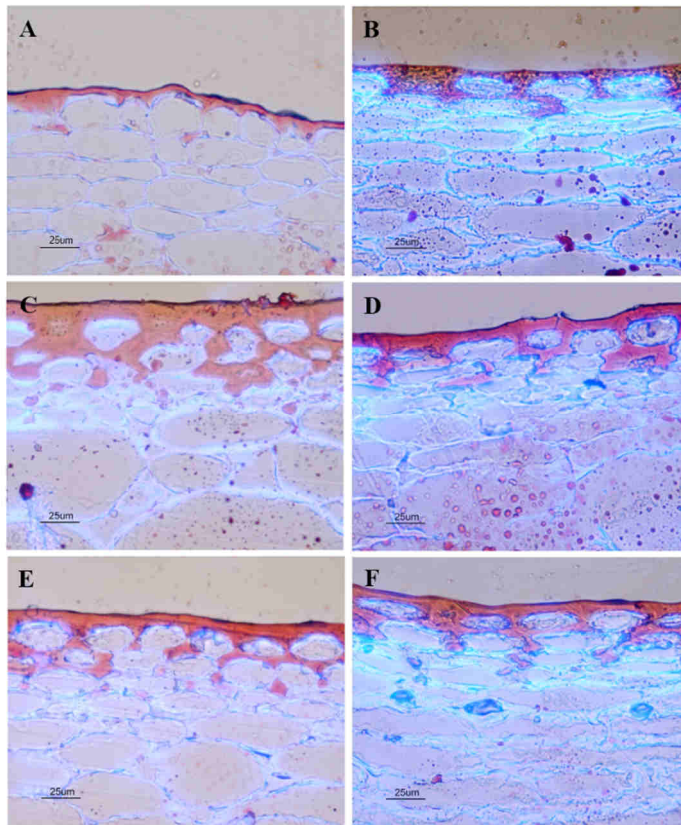
El estudio del tamaño y forma de las células de la epidermis se realizó en dos fases, por un lado, a partir de conteos realizados en imágenes de microscopía electrónica de barrido de la superficie del ovario y de cuatro estadios del desarrollo del fruto, se estimó la densidad de células epidérmicas (cantidad de células epidérmicas presentes por unidad de área). Partiendo de estos resultados se escogieron dos estadios del desarrollo, verde maduro y rojo maduro, donde se midieron las dimensiones celulares.

La Figura 2-11 muestra los datos de la densidad celular obtenidos. Los tres genotipos manifestaron el patrón habitual durante el desarrollo, mostrando una disminución de la densidad celular a lo largo del mismo. En el ovario y en los estadios VI y VM, tanto las plantas que sobreexpresan únicamente el gen *PhCHI* como las plantas que lo sobreexpresan junto con el gen *GhFNS* mostraron una menor cantidad de células epidérmicas por unidad de área, sin haber diferencias significativas entre ambos genotipos. En el estadio pintón, los frutos *CHIOx* pasaron a mostrar la mayor densidad celular junto con los frutos de las plantas MM control. Una vez que se alcanzó el estadio RM, la mayor cantidad de células epidérmicas la presentaron los frutos *CHIOx*.



**Figura 2-11.** Densidad de células epidérmicas a lo largo del desarrollo del fruto de procedentes de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIOx* y *CHI/FNSox*. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre genotipos para cada estadio ( $p \leq 0,05$ ).

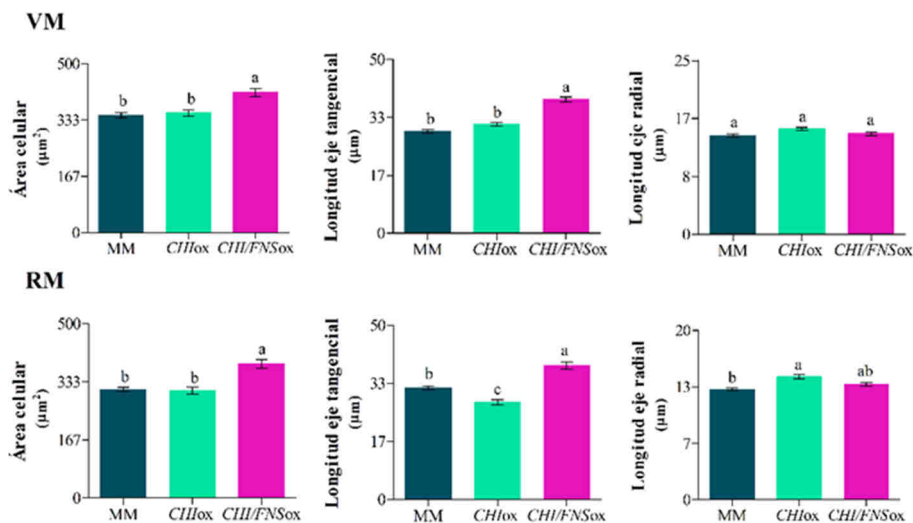
El análisis de los cortes histológicos mostró diferencias en el tamaño y la morfología de las células epidérmicas. De acuerdo con la orientación de las muestras, la superficie de célula epidérmica expuesta en el corte histológico determinó el tamaño celular y la longitud de los ejes tangencial y radial, la forma de dichas células.



**Figura 2-12.** Microfotografías de cortes histológicos de pericarpio de frutos de tomate en dos estadios del desarrollo procedentes de plantas homocigotas *CHIox* y *CHI/FNSox* y su control MM. MM: A,B; *CHIox*: C,D; *CHI/FNSox*: E,F. Verde inmaduro: A,C,E; rojo maduro: B,D,F. Los cortes están teñidos con Sudán IV y calcoflúor.

Tanto el tamaño como la forma celular se vieron afectados con la modificación de la ruta biosintética de los flavonoides en los estadios VM y RM del fruto (Figura 2-13). Así, las células epidérmicas de los frutos *CHI/FNSox* fueron los que presentaron un mayor tamaño y una forma más alargada en los dos estadios de desarrollo estudiados. Sin embargo, las

células de los frutos *CHlox* en estadio RM fueron las que presentaron una forma más redondeada, mostrando una ratio menor entre la longitud del eje tangencial y del radial.



**Figura 2-13.** Tamaño de las células epidérmicas medido en dos estadios del desarrollo de frutos procedentes de plantas MM control y plantas homocigotas *CHlox* y *CHI/FNSox*. En la fila superior se muestran los gráficos correspondientes al estadio verde maduro (VM) y en la inferior los de rojo maduro (RM). Los datos se representan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Al igual que ya se hiciera para el estudio del tamaño y la forma de las células epidérmicas, en el análisis histológico del epicarpo se determinó también el grosor y el grado de invaginación de la cutícula (Tabla 2-2), así como el número de capas celulares que conformaba la hipodermis. Tanto el grosor como el grado de invaginación de la cutícula del fruto se vieron afectados por la sobreexpresión de los genes de petunia y gerbera. Los frutos de las plantas *CHI/FNSox* fueron los que presentaron un mayor grado de invaginación durante todo el desarrollo del fruto, desde el estadio VM hasta RM y un mayor grosor de la cutícula durante la maduración. Los frutos de las plantas MM control presentaron un grado de invaginación de la cutícula similar al observado en los frutos de las plantas *CHlox* en el estadio VM, sin embargo, al llegar a RM, los frutos MM presentaron el menor grado de invaginación de la cutícula. En cuanto al grosor, los frutos MM control fueron los que presentaron los valores más bajos durante todo el desarrollo.

La sobreexpresión de dichos genes no afectó al número de capas de células hipodérmicas el cual osciló entre 2 y 3 (datos no mostrados).

**Tabla 2-2.** Grosor y grado de invaginación de la cutícula de fruto de tomate en cuatro estadios del desarrollo procedentes de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIOx* y *CHI/FNSox* cultivadas en verano. Los valores de grado de invaginación están expresados en unidades arbitrarias. VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre genotipos para un mismo estadio ( $p \leq 0,05$ ).

<b>Estadio</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Grosor (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Grado invaginación</b>
<b>VI</b>	MM	2,57 $\pm$ 0,09 c	0,25 $\pm$ 0,02 c
	<i>CHIOx</i>	6,66 $\pm$ 0,17 a	1,79 $\pm$ 0,03 a
	<i>CHI/FNSox</i>	5,92 $\pm$ 0,12 b	1,47 $\pm$ 0,02 b
<b>VM</b>	MM	6,28 $\pm$ 0,14 c	1,50 $\pm$ 0,05 b
	<i>CHIOx</i>	8,81 $\pm$ 0,13 a	1,65 $\pm$ 0,06 b
	<i>CHI/FNSox</i>	7,62 $\pm$ 0,11 b	2,52 $\pm$ 0,06 a
<b>P</b>	MM	5,34 $\pm$ 0,12 c	1,27 $\pm$ 0,03 b
	<i>CHIOx</i>	6,31 $\pm$ 0,12 b	1,38 $\pm$ 0,04 b
	<i>CHI/FNSox</i>	6,80 $\pm$ 0,11 a	2,29 $\pm$ 0,07 a
<b>RM</b>	MM	5,16 $\pm$ 0,14 c	1,11 $\pm$ 0,05 c
	<i>CHIOx</i>	7,08 $\pm$ 0,11 b	1,30 $\pm$ 0,06 b
	<i>CHI/FNSox</i>	7,68 $\pm$ 0,15 a	2,12 $\pm$ 0,05 a

En la Tabla 2-3 se muestran los valores obtenidos de cantidad de cutícula aislada y de sus principales componentes (cutina, polisacáridos, ceras y fenoles) en peso por unidad de superficie a lo largo del desarrollo del fruto MM y en las plantas transgénicas homocigotas en la temporada de verano. En cuanto a cantidad total de cutícula se refiere, es destacable el aumento que se produjo en todos los genotipos entre los estadios VI y VM, manteniéndose más o menos constante a partir de aquí hasta el final del desarrollo. Los frutos de las plantas *CHI/FNSox* fueron los que presentaron los valores más altos durante todo el desarrollo seguidos de los frutos *CHIOx*, mientras que los frutos MM control presentaron los valores de cantidad total de cutícula más bajos. La mayor cantidad de cutícula en los frutos modificados genéticamente fue acompañada, por lo general, de un aumento en la cantidad de cutina tanto en las plantas *CHIOx* como en *CHI/FNSox*. Sin embargo, la cantidad de polisacáridos aumentó en las plantas *CHI/FNSox*, pero descendió durante la maduración de los frutos *CHIOx*. Las variaciones de estos

compuestos se dieron no sólo en cuanto a cantidad sino también en el porcentaje que ellos representan en la cutícula. La cantidad de ceras presentó un comportamiento más variable. En el estadio VI, a pesar de que las plantas homocigotas presentaron una mayor cantidad de ceras ( $34-39 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) con respecto al control, éstas cantidades supusieron un menor porcentaje. Mientras que el porcentaje de ceras en las cutículas de MM y *CHIox* fue de aproximadamente un 2,5%, en las plantas *CHI/FNSox* fue del 1,6%. En los demás estadios del desarrollo, se observó en general un aumento significativo de ceras en las plantas modificadas genéticamente, siendo este aumento más notable en el caso de *CHI/FNSox* homocigota, donde el porcentaje de ceras alcanzó un valor de 5,5% en el estadio RM. La cantidad de fenoles en los estadios iniciales del desarrollo fue significativamente superior en las plantas *CHI/FNSox*. Esta cantidad de fenoles se mantuvo a lo largo del desarrollo del fruto, a diferencia de MM donde en el estadio P mostró un aumento considerable. En los estadios P y RM de los frutos MM, los fenoles representaron aproximadamente un 7% de la cutícula, mientras que en las plantas transgénicas este porcentaje disminuyó hasta aproximadamente el 0,8%.

Al comparar los datos de cantidad de los componentes cuticulares entre las plantas hemicigotas y homocigotas (Tablas 2-4 y 2-5) se observó que al inicio del desarrollo son las plantas hemicigotas, tanto *CHIox* como *CHI/FNSox* las que presentaron menor cantidad de cutícula, mientras que al llegar al estadio RM fueron las plantas homocigotas en ambos casos las que presentaron los valores más bajos. Esta disminución en la cantidad de cutícula vino dada principalmente por una reducción en las cantidades de cutina y/o polisacáridos.

Al analizar la cantidad de cutícula total y de sus componentes en frutos de tomate de la temporada de invierno (Anexo VI), se observó en general, que las diferencias en cantidades tanto de la cutícula como de sus componentes eran menores en los frutos de las plantas transgénicas al inicio del desarrollo con respecto a los datos de la temporada de verano. A pesar de que las diferencias se vieron reducidas, se observó de nuevo que los frutos de las plantas *CHI/FNSox* fueron los que presentaron valores más altos de cutícula, cutina, polisacáridos y ceras (salvo la cantidad de ceras en el estadio VI y la cantidad de cutina en el estadio VM donde *CHIox* presentó los valores más altos) mientras que los frutos control seguían presentando los valores más

bajos. En cuanto a la cantidad de fenoles en el material de invierno, las cutículas de los frutos *CHIox* fueron las que presentaron valores más bajos con respecto a los otros dos genotipos estudiados al final del desarrollo del fruto.

**Tabla 2-3.** Cantidad de cutícula y de sus principales componentes, cutina, polisacáridos, ceras y fenoles, de frutos en cuatro estadios de desarrollo procedentes de plantas cultivadas en verano de MM control y plantas homocigotas *CHIox* y *CHI/FNSox*. Los valores se expresan en  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre genotipos para un mismo estadio ( $p \leq 0,05$ ).

	MM	<i>CHIox</i>	<i>CHI/FNSox</i>
<b>Cutícula</b>			
VI	1086,8 $\pm$ 43,2 c	1445,8 $\pm$ 78,6 b	2339,9 $\pm$ 69,6 a
VM	1653,3 $\pm$ 52,7 c	2081,4 $\pm$ 60,5 b	2413,9 $\pm$ 57,1 a
P	1666,6 $\pm$ 63,9 c	1865,6 $\pm$ 55,4 b	2565,0 $\pm$ 54,0 a
RM	1861,7 $\pm$ 57,8 b	2033,7 $\pm$ 60,4 b	2679,7 $\pm$ 47,6 a
<b>Cutina</b>			
VI	702,2 $\pm$ 27,9 c	943,6 $\pm$ 51,3 b	1563,0 $\pm$ 46,7 a
VM	1046,2 $\pm$ 33,4 c	1492,9 $\pm$ 43,4 b	1617,0 $\pm$ 38,2 a
P	1080,8 $\pm$ 41,4 c	1381,4 $\pm$ 41,0 b	1764,6 $\pm$ 37,2 a
RM	1249,5 $\pm$ 38,8 c	1536,3 $\pm$ 45,6 b	1675,3 $\pm$ 29,8 a
<b>Polisacáridos</b>			
VI	357,5 $\pm$ 14,2 c	467,8 $\pm$ 25,4 b	739,6 $\pm$ 22,1 a
VM	564,0 $\pm$ 18,0 b	526,6 $\pm$ 15,3 b	731,6 $\pm$ 17,3 a
P	546,4 $\pm$ 20,9 b	442,2 $\pm$ 13,1 c	708,8 $\pm$ 14,9 a
RM	560,5 $\pm$ 17,4 b	440,7 $\pm$ 13,1 c	855,9 $\pm$ 15,2 a
<b>Ceras</b>			
VI	27,2 $\pm$ 1,1 c	34,4 $\pm$ 1,9 b	39,6 $\pm$ 1,2 a
VM	43,1 $\pm$ 1,4 c	61,9 $\pm$ 1,8 b	71,7 $\pm$ 1,7 a
P	39,4 $\pm$ 1,5 b	42,0 $\pm$ 1,2 b	105,5 $\pm$ 2,2 a
RM	51,8 $\pm$ 1,6 b	56,6 $\pm$ 1,7 b	148,5 $\pm$ 2,6 a
<b>Fenoles</b>			
VI	13,5 $\pm$ 3,2 b	14,8 $\pm$ 1,2 ab	22,6 $\pm$ 5,0 a
VM	18,3 $\pm$ 3,2 b	25,6 $\pm$ 2,4 a	16,9 $\pm$ 2,7 b
P	119,2 $\pm$ 12,2 a	35,0 $\pm$ 4,1 b	21,4 $\pm$ 4,0 b
RM	133,2 $\pm$ 5,6 a	31,8 $\pm$ 5,6 b	26,2 $\pm$ 0,7 b

**Tabla 2-4.** Cantidad de cutícula y de sus principales componentes, cutina, polisacáridos, ceras y fenoles, de frutos en cuatro estadios de desarrollo procedentes de plantas cultivadas en verano de *CHlox* hemicigotas y homocigotas. Los valores se expresan en  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre hemicigotas y homocigotas para un mismo estadio: \*:  $0,05 \geq p > 0,01$ , \*\*  $p \leq 0,01$ .

<i>CHlox</i>		
	hemicigota	homocigota
<b>Cutícula</b>		
VI	1169,5 $\pm$ 62,8 **	1445,8 $\pm$ 78,6
VM	1982,5 $\pm$ 59,4	2081,4 $\pm$ 60,5
P	1869,7 $\pm$ 56,0	1865,6 $\pm$ 55,4
RM	2122,8 $\pm$ 34,7	2033,7 $\pm$ 60,4
<b>Cutina</b>		
VI	854,7 $\pm$ 45,9	943,6 $\pm$ 51,3
VM	1283,7 $\pm$ 38,5 **	1492,9 $\pm$ 43,4
P	1225,6 $\pm$ 36,7 **	1381,4 $\pm$ 41,0
RM	1385,9 $\pm$ 22,6 **	1536,3 $\pm$ 45,6
<b>Polisacáridos</b>		
VI	295,9 $\pm$ 15,9 **	467,8 $\pm$ 25,4
VM	653,9 $\pm$ 19,6	526,6 $\pm$ 15,3**
P	585,5 $\pm$ 17,5	442,2 $\pm$ 13,1**
RM	668,4 $\pm$ 10,9	440,7 $\pm$ 13,1**
<b>Ceras</b>		
VI	18,9 $\pm$ 1,0 **	34,4 $\pm$ 1,9
VM	45,0 $\pm$ 1,3 **	61,9 $\pm$ 1,8
P	58,6 $\pm$ 1,8	42,0 $\pm$ 1,2**
RM	68,5 $\pm$ 1,1	56,6 $\pm$ 1,7 **
<b>Fenoles</b>		
VI	11,0 $\pm$ 2,6	14,8 $\pm$ 1,2
VM	14,8 $\pm$ 2,4 **	25,6 $\pm$ 2,4
P	21,7 $\pm$ 1,5 **	35,0 $\pm$ 4,1
RM	20,2 $\pm$ 4,1 *	31,8 $\pm$ 5,6

**Tabla 2-5.** Cantidad de cutícula y de sus principales componentes, cutina, polisacáridos, ceras y fenoles, de frutos en cuatro estadios de desarrollo procedentes de plantas cultivadas en verano de *CHI/FNSox* hemicigotas y homocigotas. Los valores se expresan en  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre hemicigotas y homocigotas para un mismo estadio: \*:  $0,05 \geq p > 0,01$ , \*\*  $p \leq 0,01$ .

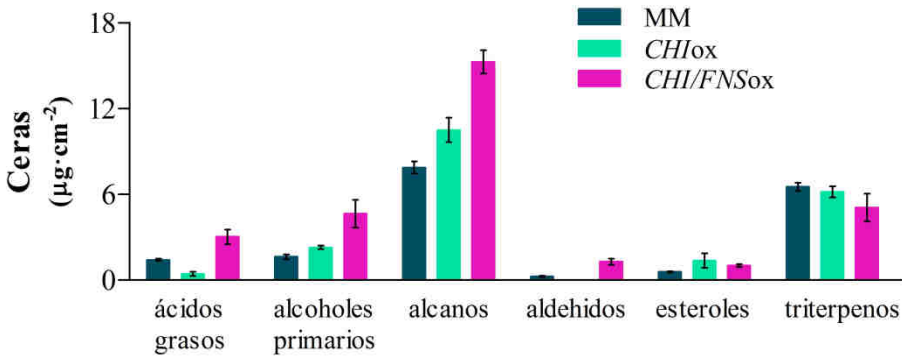
<i>CHI/FNSox</i>		
	hemicigota	homocigota
<b>Cutícula</b>		
VI	2139,0 $\pm$ 59,5 *	2339,9 $\pm$ 69,6
VM	2549,8 $\pm$ 59,3	2413,9 $\pm$ 57,1
P	2185,2 $\pm$ 53,7**	2565,0 $\pm$ 54,0
RM	2711,2 $\pm$ 46,3	2679,7 $\pm$ 47,6
<b>Cutina</b>		
VI	1567,5 $\pm$ 43,6	1563,0 $\pm$ 46,7
VM	1812,5 $\pm$ 42,1	1617,0 $\pm$ 38,2 *
P	1533,8 $\pm$ 37,7**	1764,6 $\pm$ 37,2
RM	1896,7 $\pm$ 32,4	1675,3 $\pm$ 29,8 **
<b>Polisacáridos</b>		
VI	556,1 $\pm$ 15,5**	739,6 $\pm$ 22,1
VM	666,7 $\pm$ 15,5 **	731,6 $\pm$ 17,3
P	582,8 $\pm$ 14,3 **	708,8 $\pm$ 14,9
RM	711,2 $\pm$ 12,1 **	855,9 $\pm$ 15,2
<b>Ceras</b>		
VI	24,8 $\pm$ 0,7 **	39,6 $\pm$ 1,2
VM	66,9 $\pm$ 1,6 *	71,7 $\pm$ 1,7
P	68,6 $\pm$ 1,7 **	105,5 $\pm$ 2,2
RM	103,3 $\pm$ 1,8 **	148,5 $\pm$ 2,6
<b>Fenoles</b>		
VI	29,7 $\pm$ 3,0	22,6 $\pm$ 5,0
VM	22,0 $\pm$ 3,7	16,9 $\pm$ 2,7
P	14,3 $\pm$ 2,2	21,4 $\pm$ 4,0
RM	34,5 $\pm$ 3,3	26,2 $\pm$ 0,7 *



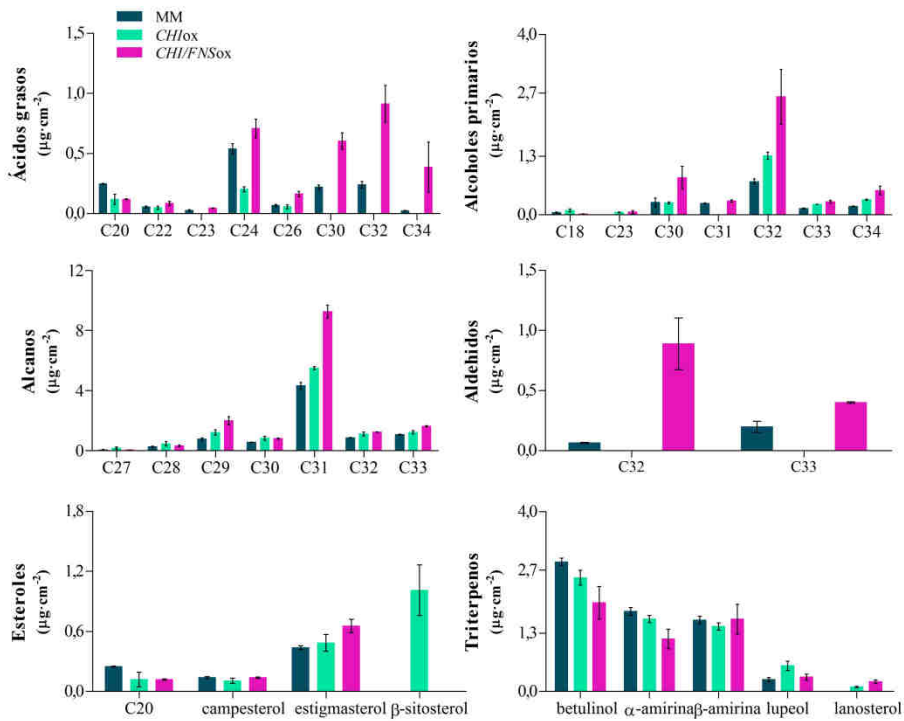
Como se ha mostrado anteriormente, se produjo un aumento significativo en los componentes lipídicos de las cutículas (ceras y cutina) de los frutos de tomate procedentes de las plantas transgénicas. El análisis cualitativo de dichos componentes se llevó a cabo en el material de verano mediante cromatografía de gases en colaboración con el Dr. Lukas Schreiber (Institute of Cellular and Molecular Botany, Bonn, Alemania).

Las Figuras 2-14 y 2-15 muestran cómo la sobreexpresión del gen de petunia y, en mayor medida, la sobreexpresión del gen de petunia junto con el de gerbera, provocaron un aumento de la cantidad de ácidos grasos, alcoholes primarios, alcanos y aldehídos mientras que no se observaron diferencias en cuanto a la cantidad de esteroides y triterpenos entre los genotipos (Figura 2-14).

En la Figura 2-15 se ve con más detalle qué compuestos son los que varían para cada tipo de ceras. La disminución observada en la cantidad de ácidos grasos en las cutículas de los frutos *CHI*ox (Figura 2-14) fue debida a una menor acumulación de los compuestos C24, C30, C32 y C34 (Figura 2-15) mientras que el aumento observado en las cutículas de *CHI/FNS*ox se debe al aumento en mayor medida de los compuestos C30, C32 y C34. En el caso de los alcoholes primarios y de los aldehídos, el aumento observado en las cutículas *CHI/FNS*ox fue debido principalmente a los compuestos C32 mientras que, en el grupo de los alcanos, son los compuestos C31 los responsables del aumento en dichas cutículas. Con respecto a los esteroides, cabe destacar que las cutículas pertenecientes a los frutos de las plantas que sobreexpresan el gen *PhCHI* presentaron  $\beta$ -sitosterol a diferencia de los otros dos genotipos, donde dicho compuesto no estuvo presente. En cuanto a los triterpenos, el lanosterol estuvo presente sólo en las cutículas de los frutos transgénicos.

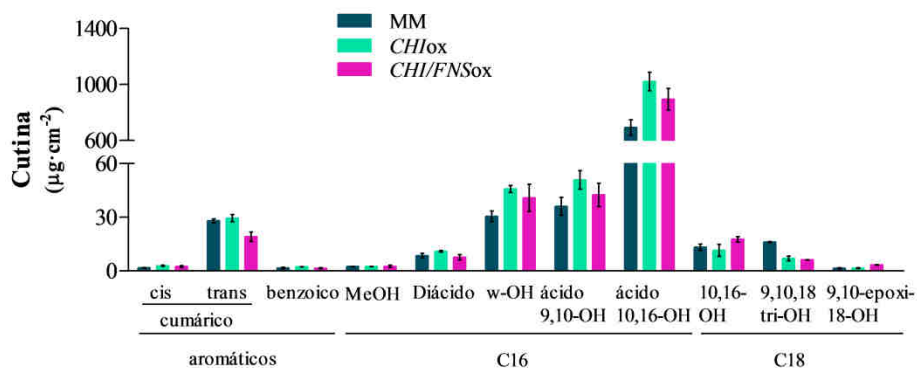


**Figura 2-14.** Composición cualitativa de las ceras de la cutícula de frutos rojo maduro procedentes de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIox* y *CHI/FNSox* cultivadas en verano. Se analizaron los tipos de ceras (A) y las longitudes de cadena de los diferentes tipos de ceras (B) en cutículas. Los valores se expresan en  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.



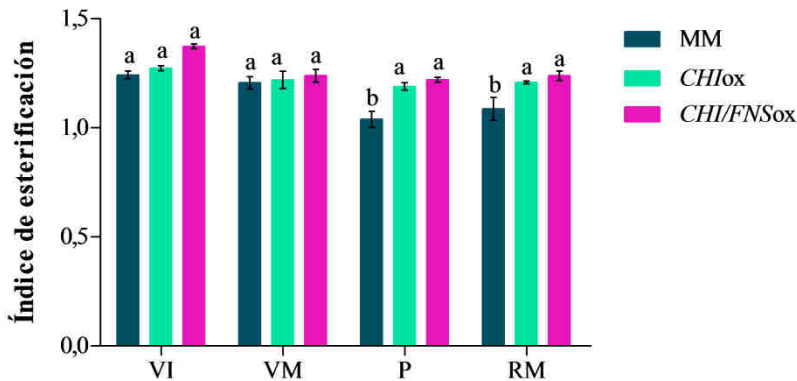
**Figura 2-15.** Composición cualitativa de los distintos tipos de ceras de la cutícula de frutos rojo maduro procedentes de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIox* y *CHI/FNSox* cultivadas en verano. Los valores se expresan en  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.

Con respecto a la composición de la matriz de cutina, la sobreexpresión del gen de petunia provocó un aumento en la cantidad total de ácidos grasos (medida en  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), aproximadamente de 1,5 veces la cantidad de ácidos presentes en el control MM, mientras que la sobreexpresión de ambos genes, *PhCHI* y *GhFNS*, provocó un aumento de 1,2 veces la cantidad observada en el control. El aumento observado en las cutinas *CHIox* fue debido al aumento de los ácidos aromáticos (cis-cumárico y benzoico) y de los ácidos C16 (w-OH, 9,10-diOH y 10,16-di-OH). Por el contrario, en estas muestras la cantidad de ácido C18 9,10 18-tri-OH se vio reducida a más de la mitad de lo observado en el control. En el caso del aumento observado en la cantidad total de ácidos de los frutos *CHI/FNSox* fue debido al aumento en las cantidades del ácido cis-cumárico y del C18 9,10-epoxi-18-OH, donde los valores de éste último fueron el doble de los valores observados en MM control. La cantidad de los ácidos trans-cumárico y C18 9,10,18-tri-OH se vio reducida a la mitad en los frutos *CHI/FNSox* con respecto al control (Figura 2-16).



**Figura 2-16.** Composición cualitativa de la cutina de frutos rojo maduro procedentes de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIox* y *CHI/FNSox* cultivadas en verano. Los valores se expresan en  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.

La sobreexpresión de los genes *PhCHI* y *PhCHI/GhFNS* provocó un aumento del índice de esterificación de la cutina en los estadios P y RM. En los estadios iniciales del desarrollo en los cuales se produce el crecimiento del fruto, se observó un mayor índice de esterificación en las plantas transgénicas aunque sin llegar a ser estas diferencias significativas (Figura 2-17).



**Figura 2-17.** Índice de esterificación de la cutina aislada de frutos en cuatro estadios del desarrollo procedentes de plantas cultivadas en verano de MM control y plantas homocigotas *CHIox* y *CHI/FNSox*. VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre genotipos para un mismo estadio ( $p \leq 0,05$ ).

Para el estudio de las propiedades mecánicas de la cutícula durante el desarrollo del fruto de tomate se realizaron los correspondientes ensayos de fluencia. La Tabla 2-6 muestra los valores de los diferentes parámetros biomecánicos obtenidos en este estudio. En los diferentes estadios del desarrollo y la maduración del fruto se observaron diferencias significativas en cuanto a las propiedades mecánicas entre los genotipos estudiados en los parámetros de módulo elástico, esfuerzo de cedencia y fractura de la cutícula. Con relación a la rigidez de las cutículas aisladas, desde el inicio de desarrollo y hasta el final de la maduración del fruto, las cutículas de MM fueron las que presentaron los valores más altos. Si bien en los estadios VM y P las cutículas de los frutos *CHI/FNSox* también presentaron junto con las de MM estos valores más altos, en el estadio RM presentaron los valores de rigidez más bajos junto con las cutículas de los frutos *CHIox*. En cuanto a la deformación de cedencia, sólo en RM se observó que las cutículas MM presentaron un valor significativamente inferior con respecto a los genotipos transgénicos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los genotipos en cuanto a deformación máxima. Los valores de esfuerzo de cedencia y de fractura, desde el estadio VI hasta pintón variaron de manera que las diferencias iniciales observadas (MM mostró los valores más altos) se perdieron al alcanzar el estadio P, llegando a no haber diferencias significativas entre los genotipos. Sin embargo, en el estadio RM volvieron a

mostrar diferencias y, así MM presentó de nuevo los valores más altos seguido de *CHlox* y *CHI/FNSox*.

**Tabla 2-6.** Parámetros biomecánicos de las cutículas aisladas de frutos en cuatro estadios de desarrollo procedentes de plantas de MM control y plantas homocigotas *CHlox* y *CHI/FNSox* cultivadas en verano. VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los valores del módulo elástico y los esfuerzos de cedencia y fractura se expresan en MPa. La deformación de cedencia y máxima como porcentaje. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre genotipos para un mismo estadio ( $p \leq 0,05$ ).

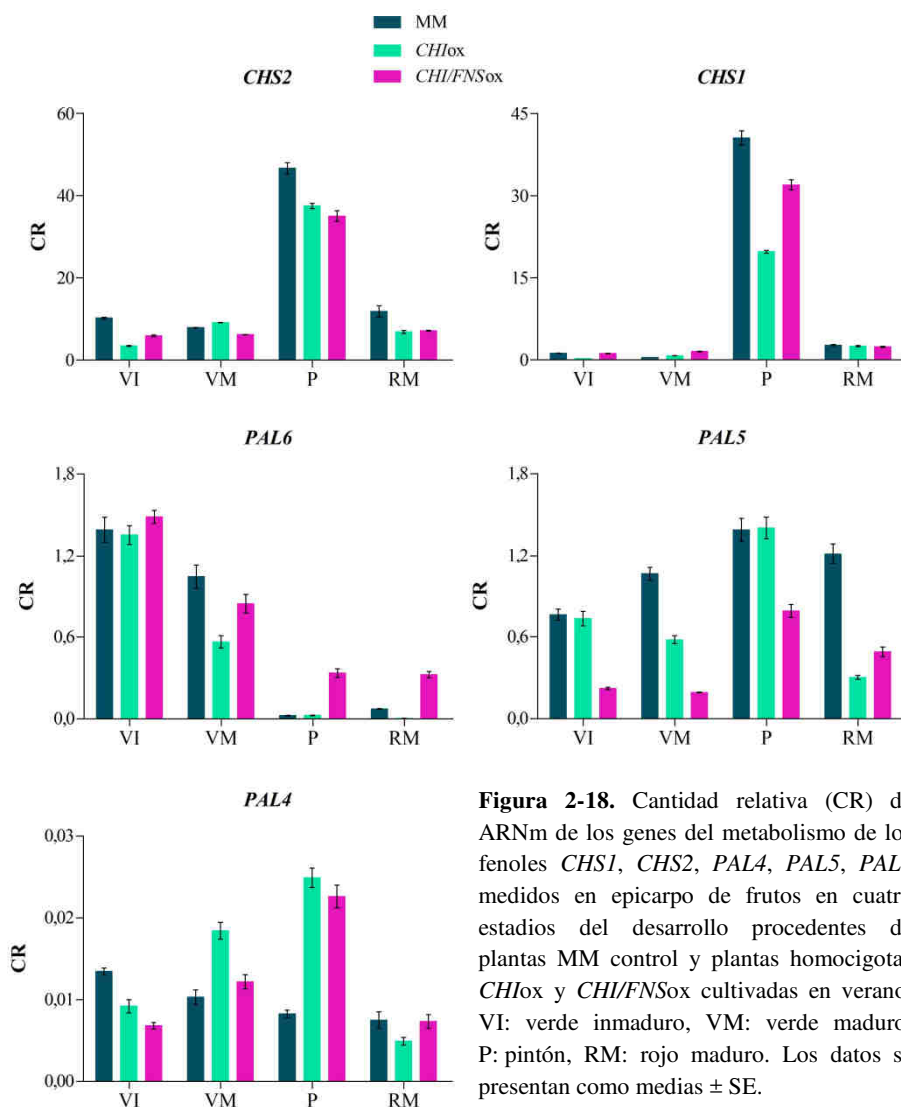
	MM	<i>CHlox</i>	<i>CHI/FNSox</i>
<b>Módulo elástico</b>			
VI	551,7 $\pm$ 38,0 a	431,6 $\pm$ 49,7 ab	344,4 $\pm$ 50,1 b
VM	708,7 $\pm$ 31,8 a	418,1 $\pm$ 33,8 b	757,6 $\pm$ 74,8 a
P	1052,9 $\pm$ 84,6 a	564,5 $\pm$ 89,3 b	1014,7 $\pm$ 35,6 a
RM	1110,7 $\pm$ 57,1 a	706,3 $\pm$ 62,1 b	707,7 $\pm$ 49,5 b
<b>Esfuerzo de cedencia</b>			
VI	45,8 $\pm$ 3,1 a	21,3 $\pm$ 1,6 b	22,1 $\pm$ 0,0 b
VM	19,1 $\pm$ 1,7 ab	16,5 $\pm$ 1,5 b	24,0 $\pm$ 1,1 a
P	35,9 $\pm$ 2,5 a	28,0 $\pm$ 3,5 a	36,1 $\pm$ 1,4 a
RM	25,4 $\pm$ 0,01 a	23,8 $\pm$ 0,7 ab	19,9 $\pm$ 1,9 b
<b>Deformación de cedencia</b>			
VI	8,9 $\pm$ 0,9 a	4,9 $\pm$ 0,8 a	6,9 $\pm$ 1,3 a
VM	2,7 $\pm$ 0,2 a	4,3 $\pm$ 0,4 a	3,3 $\pm$ 0,2 a
P	3,5 $\pm$ 0,2 a	5,3 $\pm$ 1,0 a	3,6 $\pm$ 0,1 a
RM	2,3 $\pm$ 0,2 b	3,7 $\pm$ 0,5 a	3,5 $\pm$ 0,2 a
<b>Esfuerzo de fractura</b>			
VI	57,3 $\pm$ 2,8 a	29,4 $\pm$ 0,0 b	33,2 $\pm$ 3,2 b
VM	43,4 $\pm$ 3,5 a	30,1 $\pm$ 2,9 b	50,6 $\pm$ 1,6 a
P	68,7 $\pm$ 4,9 a	59,0 $\pm$ 3,5 a	66,1 $\pm$ 2,3 a
RM	71,3 $\pm$ 9,5 a	57,4 $\pm$ 2,0 b	45,8 $\pm$ 2,4 b
<b>Deformación máxima</b>			
VI	12,6 $\pm$ 1,4 a	8,4 $\pm$ 1,3 a	12,9 $\pm$ 0,9 a
VM	11,2 $\pm$ 1,8 a	12,1 $\pm$ 1,8 a	14,9 $\pm$ 1,6 a
P	12,6 $\pm$ 1,5 a	18,2 $\pm$ 2,3 a	16,1 $\pm$ 1,4 a
RM	13,3 $\pm$ 1,9 a	17,1 $\pm$ 1,6 a	13,1 $\pm$ 1,8 a

## VI. Expresión génica

Una vez caracterizado el epicarpo de los frutos de tomate *CHlox* y *CHI/FNSox* con respecto a su control y viendo las diferencias en cuanto a características morfológicas, composición de la cutícula y las diferencias en las propiedades mecánicas se decidió realizar un estudio de la expresión de una serie de genes clave en la síntesis de la cutícula y de la síntesis de los flavonoides (Figuras 2-18, 2-19, 2-20). Para ello se midió la cantidad relativa de ARNm (CR) de los genes seleccionados mediante RT-PCR. Con dicho análisis se determinó que la sobreexpresión tanto del gen *PhCHI* como la de *PhCHI* junto con *GhFNS* afectaron a la expresión de los genes seleccionados en la CR y en el patrón de expresión.

La Figura 2-18 muestra la expresión de los genes de la ruta de síntesis de flavonoides seleccionados. Con respecto a los genes *PAL*, se seleccionaron *PAL4*, *PAL5* y *PAL6*, para su estudio. Los genes *PAL4* y *PAL5* están descritos en la bibliografía como genes que se expresan en fruto durante la maduración (Bovy et al., 2002; Adato et al, 2009). El gen *PAL6* se escogió a partir de los resultados de un análisis de microarray realizado por nuestro grupo empleando la micromatriz de ADNc TOM2 en estadios iniciales del desarrollo del fruto de tomate (datos no publicados). En cuanto a los genes *CHS* se seleccionaron *CHS1* y *CHS2* debido al aumento significativo de la expresión durante la maduración, concretamente en el estadio pintón (Ballester et al., 2010; España et al., 2014b).

Tanto las plantas *CHlox* y *CHI/FNSox* como sus correspondientes controles MM presentaron los niveles más altos de CR de ARNm en los genes *CHS2* y *CHS1* en el estadio pintón, aunque, estos niveles fueron inferiores a los observados en el control, sobre todo en el caso de la expresión de *CHS1* del epicarpo de frutos *CHlox* donde la CR de ARNm medida fue la mitad con respecto al control. Tanto en *CHS2* como *CHS1* se observó un cambio en el patrón de expresión entre los estadios VI y VM. En el caso de MM se observó un ligero descenso en la expresión de *CHS2* en VM, sin embargo, en *CHlox* se observó en este estadio un aumento de tres veces la CR de ARNm medida en VI. En cambio, en el caso de *CHI/FNSox* los valores medidos en VI y VM fueron similares. Estas variaciones en el patrón de expresión se vieron también en *CHS1* a excepción de los valores observados en el estadio VM en MM que fueron en este caso la mitad de los medidos en VI.



**Figura 2-18.** Cantidad relativa (CR) de ARNm de los genes del metabolismo de los fenoles *CHS1*, *CHS2*, *PAL4*, *PAL5*, *PAL6* medidos en epicarpo de frutos en cuatro estadios del desarrollo procedentes de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIox* y *CHI/FNSox* cultivadas en verano. VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.

La sobreexpresión del gen *PhCHI* afectó a la expresión de *PAL6* en los estadios VM y RM de manera que la CR de ARNm de dicho gen en los frutos transgénicos se vio reducida con respecto al control, en el estadio VM a la mitad y en el estadio RM esta reducción alcanzó valores de 16 veces inferiores. En cambio, la sobreexpresión del gen *PhCHI* junto con *GhFNS* provocó un aumento con respecto a MM en la CR en el estadio pintón (aproximadamente 14 veces más) y en rojo maduro (valores en torno a 4 veces superiores). La expresión del gen *PAL5* se vio afectada tanto en los

frutos *CHIOx*, en los estadios VM y RM, como en los frutos *CHI/FNSox* durante todo el desarrollo. En el caso de los frutos *CHIOx* en VM y RM se produjo una disminución de la cantidad relativa en torno al 50 y 75% respectivamente con respecto a los frutos MM. En el caso de los frutos *CHI/FNSox* la expresión del gen *PAL5* se vio disminuida durante todo el desarrollo del fruto entre un 40% (en los estadios finales del desarrollo) y un 80% (en los estadios iniciales) en comparación con MM. También se observó un cambio en el patrón de expresión entre los estadios VI y VM donde en las plantas transgénicas se observó una disminución de la expresión a diferencia de MM donde se observó un aumento. La expresión de *PAL4* en el estadio VI fue menor en los frutos de las plantas transgénicas mientras que en los estadios VM y P se observó un aumento de dicha expresión con respecto al control, alcanzando en el estadio P una cantidad relativa hasta 3 veces superior a la de MM. En el estadio RM los frutos *CHI/FNSox* mostraron valores similares a MM mientras que *CHIOx* mostraron una disminución de la expresión en torno al 30% con respecto a los otros dos genotipos estudiados. Estas variaciones en la expresión llevaron consigo cambios en el patrón de expresión durante el desarrollo.

Con respecto a los genes estructurales relacionados con el metabolismo de la cutícula (Figura 2-19) no se observaron cambios en el patrón de expresión en la mayoría de los genes estudiados entre MM control y los frutos transgénicos salvo en el caso de *CER1-like*, *ABCG32* y *EST1*. En *CER1-like* y *ABCG32* el cambio en el patrón de expresión se dio entre los estadios VI y VM mientras que en el caso de *EST1* en MM y *CHIOx* la CR de ARNm medida en el estadio VM disminuyó con respecto a los estadios VI y P. En cambio, en los frutos *CHI/FNSox* la expresión en estos estadios se mantuvo más o menos constante y en RM se observó una disminución. En cuanto a la expresión de *CUS1*, ésta se vio afectada por la sobreexpresión de los genes *PhCHI* y *PhCHI/GhFNS* en los estadios VI y VM disminuyendo en las plantas transgénicas con respecto al control, siendo dicha disminución más acusada en el caso de los frutos *CHI/FNSox*. La expresión del gen *GDSL* también se vio reducida en el estadio VI en las plantas transgénicas, no habiendo diferencia entre los dos genotipos de sobreexpresión. En el estadio VM, sin embargo, la expresión en los frutos *CHIOx* se redujo con respecto a MM mientras que en los frutos *CHI/FNSox* hubo un aumento de dicha expresión. Por el contrario, en el caso del gen *CYP86A69* la disminución de la expresión en los genotipos transgénicos se



dio en VM mientras que en VI la expresión en los frutos *CHIOx* aumentó con respecto a los otros dos genotipos. En ninguno de estos tres genes (*CUS1*, *GDSL* y *CYP86A69*) se detectó expresión en los estadios P y RM. La sobreexpresión de *GhFNS* junto con *PhCHI* modificó la expresión de *CYP86A68* durante todo el desarrollo. En los estadios iniciales provocó una disminución del transcrito con respecto a MM y *CHIOx*, en cambio, en los estadios P y RM se observó un aumento. En el estadio pintón los niveles de *CYP86A68* fueron similares entre las plantas transgénicas.

Por otro lado, los frutos *CHIOx* en el estadio VI mostraron una disminución de la expresión de *CER6* con respecto MM. Sin embargo, en los estadios VM y P no se encontraron diferencias con respecto al control. En el estadio RM dichos frutos fueron los que presentaron los niveles más altos de expresión (aproximadamente el doble que el control). En cambio, la sobreexpresión de *PhCHI/GhFNS* llevó consigo una reducción de la expresión de *CER6* durante todo el desarrollo, siendo esta disminución más acusada en el estadio VI, donde los niveles de expresión del gen fue la mitad que los de MM. La expresión del gen *CER1-like* se vio afectada tanto por la sobreexpresión del gen de petunia como por la sobreexpresión de los genes de petunia y gerbera conjuntamente, donde en los estadios VI y P se observó una disminución gradual de la cantidad relativa de ARNm medida de tal manera que los frutos MM presentaron los valores más altos, *CHIOx* valores intermedios y *CHI/FNSox* mostraron los valores más bajos. En el estadio VM, la expresión del gen *CER1-like* en los frutos *CHIOx* aumentó con respecto a los otros dos genotipos, los cuales mostraron valores similares. En el estadio RM no se vieron diferencias en cuanto a la expresión de *CER1-like* entre los genotipos.

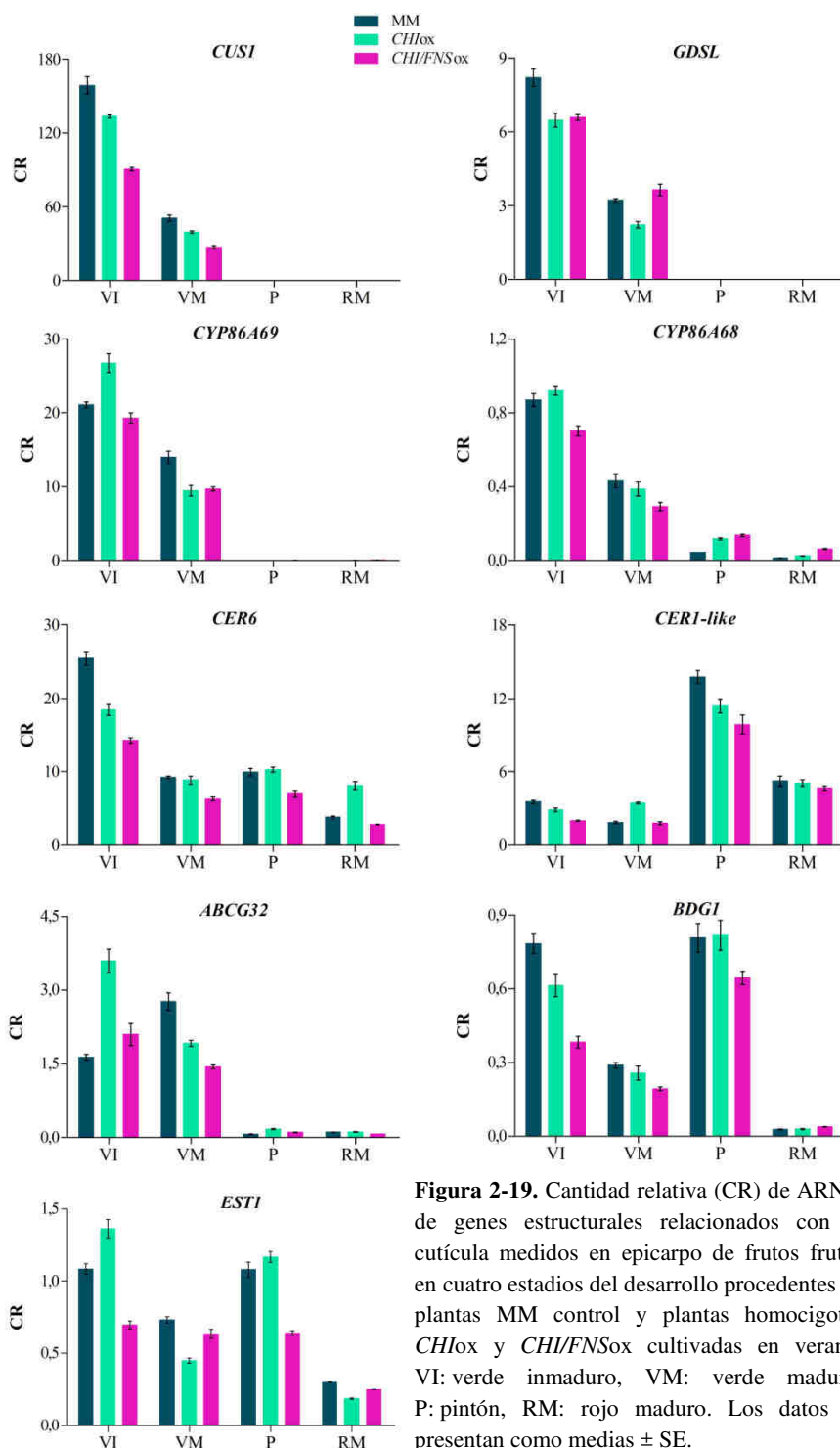
La expresión del gen que codifica para el transportador *ABCG32* se vio afectada de manera que en el estadio VI las plantas transgénicas presentaron niveles más altos que MM siendo dicho aumento más notable en el caso de la sobreexpresión de *PhCHI* cuyos niveles de expresión toma valores de más del doble del control. En cambio, en el estadio VM la sobreexpresión de los genes conllevó una disminución de *ABCG32* de manera gradual. Así MM presentó los niveles más altos, *CHI/FNSox* los más bajos y *CHIOx* presentó valores intermedios.

Las modificaciones en cuanto a la expresión del gen *BODYGUARD* (*BDG1*) en los frutos transgénicos con respecto al control MM fueron

equivalentes a las observadas en el gen *CER6* en los estadios VI, VM y P. Así, los frutos *CHI/FNSox* vieron reducida su expresión con respecto a MM en los estadios VI, VM y P mientras que los frutos *CHIOx* sólo vieron reducida su expresión en el estadio VI. Cabe destacar que los niveles de expresión en VI de *CHI/FNSox* se redujo en más del 50% con respecto al control. En RM todos presentaron niveles similares de dicho gen.

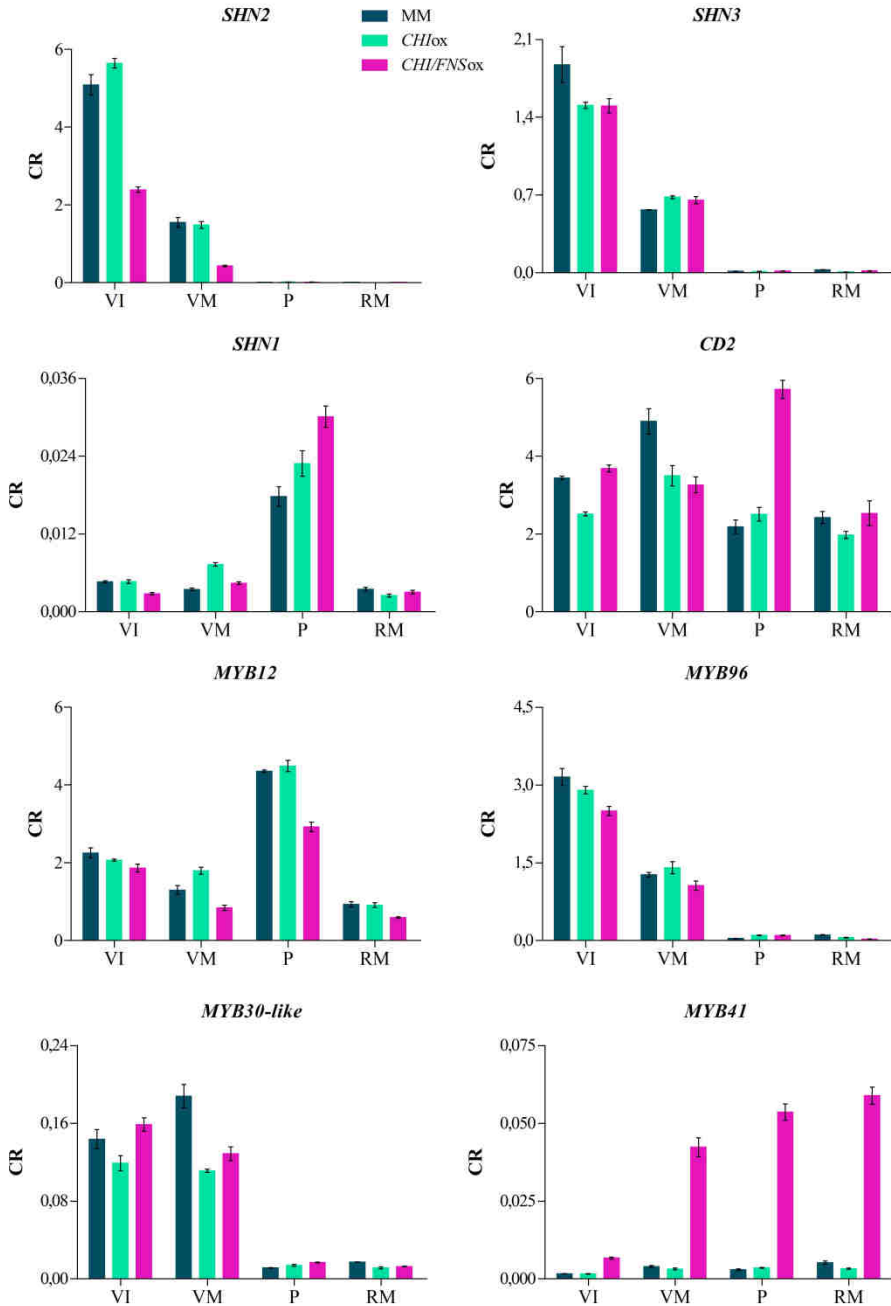
En el caso de la expresión del gen *ESTERASAI* la sobreexpresión de *PhCHI* y de *PhCHI/GhFNS* afectaron de manera contraria. Así, en los estadios VI y P los frutos *CHIOx* aumentaron su expresión con respecto a los frutos *CHI/FNSox*, siendo dicho aumento de más del 50%. En cambio, en el estadio VM los frutos *CHI/FNSox* fueron los que presentaron los valores más altos en comparación con *CHIOx*. En este caso el aumento fue mucho menor (~30%).

Los factores de transcripción que regulan las rutas de síntesis de la cutícula y flavonoides también se vieron afectados por la sobreexpresión de los genes de petunia y gerbera (Figura 2-20). La sobreexpresión conjunta de los genes *PhCHI* y *GhFNS* tuvo asociada los cambios más fuertes en la expresión de dichos factores de transcripción. Así, podemos ver en la Figura 2-22 que el descenso que se produjo en los niveles de expresión en los estadios VI y VM fue de más del 50%. Por otro lado, la expresión en el estadio P de los genes SHN1 y CD2 se vio incrementada con respecto a los otros dos genotipos, siendo dicho aumento en el caso de CD2 mucho más acusado (aproximadamente 3 veces más). Con respecto a la expresión de MYB12 los frutos *CHI/FNSox* son los que toman los valores más bajos de expresión. Esta reducción en la expresión fue mayor en los estadios VM y P. Por último, cabe destacar el aumento que se observó en la expresión de MYB41 en *CHI/FNSox*. A pesar de tomar unos valores de CR de ARNm muy bajos, dicho los niveles de expresión se incrementaron en todos los estadios del desarrollo del fruto (siendo dicho incremento de hasta 18 veces en el caso de P).



**Figura 2-19.** Cantidad relativa (CR) de ARNm de genes estructurales relacionados con la cutícula medidos en epicarpo de frutos en cuatro estadios del desarrollo procedentes de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIox* y *CHI/FNSox* cultivadas en verano. VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.

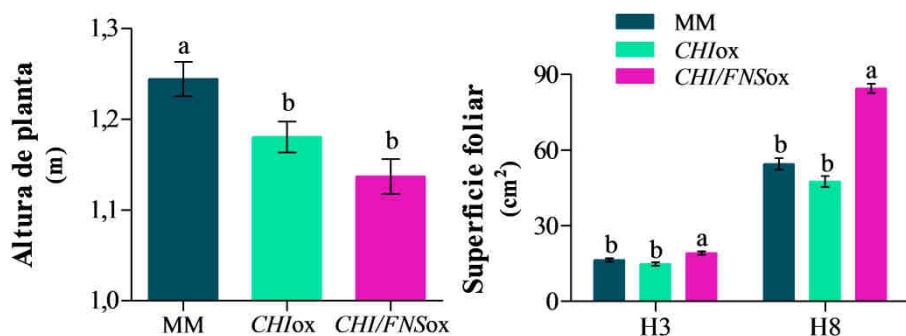
## Interacción entre las rutas de síntesis de flavonoides y de cutícula



**Figura 2-20.** Cantidad relativa (CR) de ARNm de factores de transcripción relacionados con la cutícula y flavonoides medidos en epicarpo de frutos recolectados en cuatro estadios del desarrollo y procedentes de MM, *CHIox* y *CHI/FNSox*. VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE

## V. Fase vegetativa

Durante el cultivo se observó que las plantas genéticamente modificadas mostraban diferencias en algunos aspectos fenotípicos con respecto a las plantas MM control como por ejemplo diferencias en la altura de las plantas, tamaño de las hojas o de las flores, por lo que se decidió estudiar el efecto que tiene la sobreexpresión de los genes *PhCHI* y *PhCHI/GhFNS* en la fase vegetativa de la planta (Figura 2-21). La altura de las plantas se midió en la fase inicial de la producción y se observó cómo las plantas transgénicas presentaron una menor altura que las plantas MM control, siendo el caso de *CHI/FNSox* las que mostraron los valores más bajos. El efecto que tiene la sobreexpresión de los genes *PhCHI* y *PhCHI/GhFNS* sobre la superficie foliar se estudió en dos estadios de desarrollo de la hoja: H3 y H8. Las plantas *CHI/FNSox* presentaron una mayor superficie foliar desde el inicio del desarrollo con respecto a los otros dos genotipos estudiados. Este aumento fue más notable en la H8 las cuales aumentaron la superficie en torno a un 55% con respecto al control. En cuanto al tamaño de las flores se observó que las de las plantas *CHIOx* fueron más pequeñas con respecto a las flores de *CHI/FNSox* y MM entre las cuales no se observaron diferencias notables. Estas diferencias se observaron tanto en el cultivo de verano como en el de invierno.

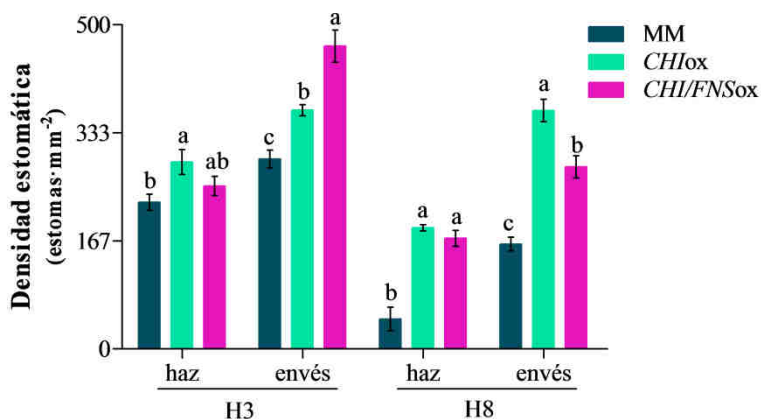


**Figura 2-21.** Altura de plantas y superficie foliar de plantas MM control y plantas homocigotas *CHIOx* y *CHI/FNSox* cultivadas en verano. H3: tercera hoja contando desde el ápice, H8: octava hoja contando desde el ápice. Los datos se representan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

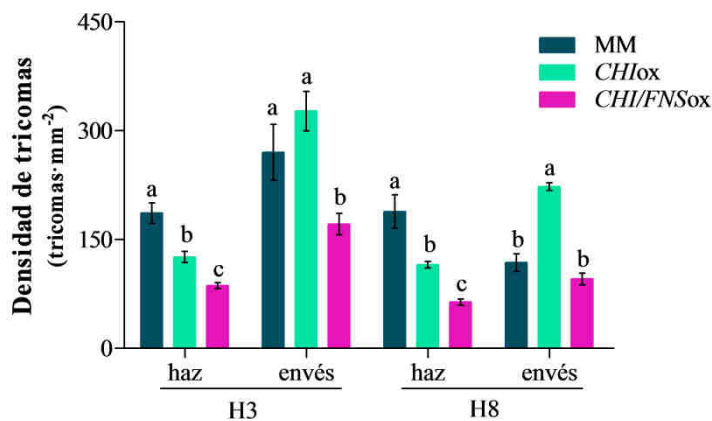
En el estudio de MEB se observaron diferencias en cuanto al número de los diferentes tipos de células epidérmicas de la hoja (células del pavimento, estomas y tricomas) entre los distintos genotipos. Para estudiar las diferencias estadísticas se realizó el cálculo de la densidad para cada tipo celular (Figuras 2-22, 2-23 y 2-24).

En condiciones normales la densidad estomática del haz de las hojas de tomate es inferior a la del envés. La sobreexpresión de los genes estudiados no afectó a este carácter (Figura 2-22), sin embargo, al estudiar las microfotografías de MEB se observó un aumento de densidad estomática en las plantas genéticamente modificadas siendo este aumento más notable en la H8 donde en el caso del envés las plantas transgénicas mostraron el doble de estomas que el control y en el haz fue hasta 4 veces más.

En cuanto al número de tricomas por unidad de superficie observado en nuestro estudio, la sobreexpresión de los genes hizo que dicha densidad disminuyese en el haz tanto de la H3 como de la H8 (Figura 2-23). Se vio una mayor disminución en las plantas que sobreexpresan *PhCHI/GhFNS*. En el envés de ambos estadios, se observó que las plantas *CHI/FNSox* presentaban una menor densidad de tricomas con respecto al control siendo sólo significativa en el caso de la H3, sin embargo, las plantas *CHIox* mostraron un aumento de dicha densidad.



**Figura 2-22.** Densidad de estomas presentes en el haz y envés de hojas en dos estadios del desarrollo. Hojas procedentes de plantas de MM control y plantas homocigotas *CHIOx* y *CHI/FNSOx* cultivadas en verano. H3: tercera hoja contando desde el ápice, H8: octava hoja contando desde el ápice. Los datos se representan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre genotipos para cada estadio y cara de la hoja ( $p \leq 0,05$ ).

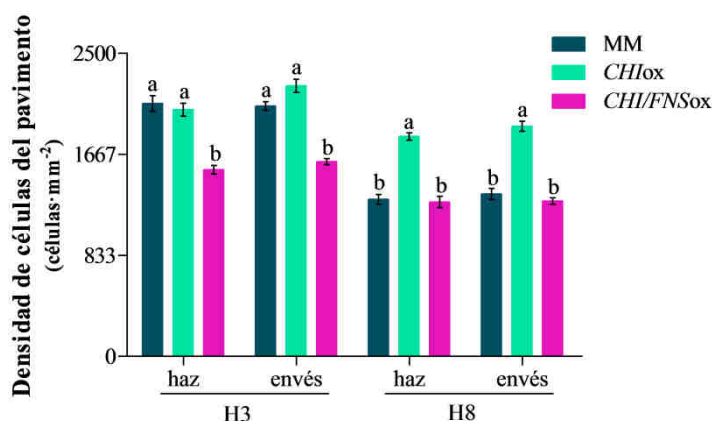


**Figura 2-23.** Densidad de tricomas presentes en el haz y envés de hojas en dos estadios del desarrollo. Hojas procedentes de plantas de MM control y plantas homocigotas *CHIOx* y *CHI/FNSOx* cultivadas en verano. H3: tercera hoja contando desde el ápice, H8: octava hoja contando desde el ápice. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre genotipos para cada estadio y cara de la hoja ( $p \leq 0,05$ ).

Con el objetivo de conocer si las diferencias o similitudes observadas en la densidad de estomas y tricomas se debían a una alteración de la ratio entre células del pavimento y células especializadas o simplemente respondía a cambios en el tamaño de las células del pavimento, se estimó la densidad de células del pavimento (Figura 2-24). Al igual que para los estomas y tricomas, el número de células del pavimento por unidad de superficie disminuyó a lo largo del desarrollo. En la tercera hoja sólo mostraron una disminución significativa las plantas *CHI/FNSox*, aproximadamente 1500 células·mm<sup>-2</sup> frente a unas 2100 que presentaron el control y las plantas *CHIOx*. Por el contrario, en la hoja octava, tanto en el haz como en el envés, las plantas *CHIOx* mostraron un aumento (1800 células·mm<sup>-2</sup>) de la densidad de células frente a los otros dos genotipos (1300 células·mm<sup>-2</sup>).

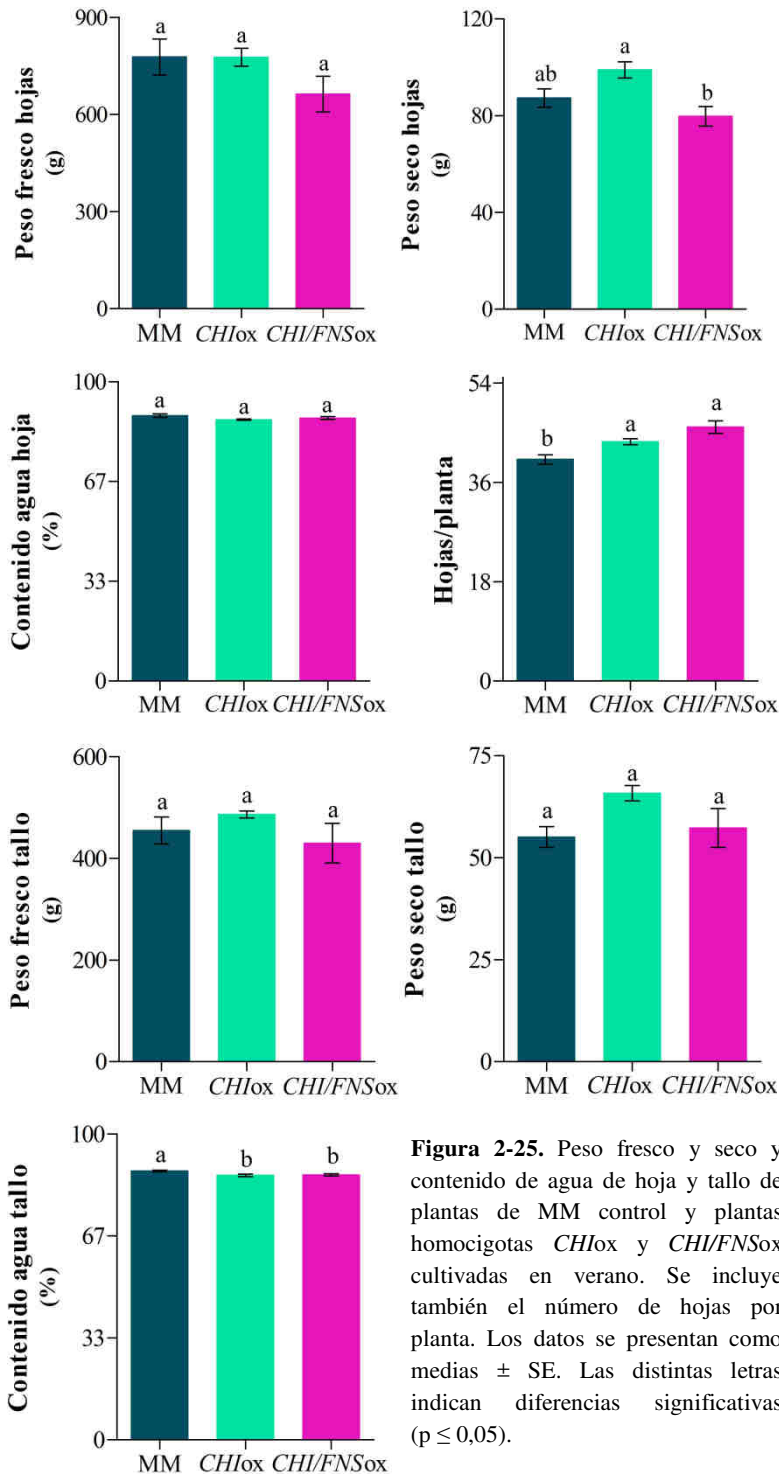
A partir de estos valores se pudo calcular las ratios células pavimento/estomas y células pavimento/tricomas. Así, en la tercera hoja la ratio entre las células del pavimento y los estomas fue significativamente superior en MM seguidas de *CHIOx* y las plantas *CHI/FNSox* mostraron los valores significativamente más bajos tanto para el haz ( $9,52 \pm 0,15$  a;  $7,17 \pm 0,06$  b;  $5,88 \pm 0,08$  c. MM, *CHIOx* y *CHI/FNSox*, respectivamente) como para el envés ( $6,88 \pm 0,09$  a;  $5,93 \pm 0,13$  b;  $3,39 \pm 0,08$  c. MM, *CHIOx* y *CHI/FNSox*, respectivamente). En el caso de la ratio células pavimento/tricomas, *CHI/FNSox* mostró valores significativamente superiores para el haz ( $16,13 \pm 0,57$  ab;  $15,43 \pm 0,56$  b;  $18,41 \pm 0,69$  a. MM, *CHIOx* y *CHI/FNSox*, respectivamente) y el envés ( $5,73 \pm 0,14$  b;  $6,32 \pm 0,37$  b;  $8,62 \pm 0,07$  a. MM, *CHIOx* y *CHI/FNSox*, respectivamente). En la hoja octava las se mantuvieron las diferencias significativas observadas en la hoja tercera tanto en el haz ( $8,58 \pm 0,05$  a;  $9,81 \pm 0,34$  b;  $7,24 \pm 0,24$  c. MM, *CHIOx* y *CHI/FNSox*, respectivamente) como en el envés ( $8,03 \pm 0,22$  a;  $5,19 \pm 0,09$  b;  $4,62 \pm 0,09$  c. MM, *CHIOx* y *CHI/FNSox*, respectivamente). La ratio entre células pavimento y de los tricomas mostró diferencias significativas entre los diferentes genotipos para el haz ( $6,97 \pm 0,10$  c;  $15,75 \pm 0,26$  b;  $19,82 \pm 0,63$  a. MM, *CHIOx* y *CHI/FNSox*, respectivamente) y para el envés ( $11,59 \pm 0,47$  b;  $8,53 \pm 0,12$  c;  $13,82 \pm 0,34$  a. MM, *CHIOx* y *CHI/FNSox*, respectivamente).





**Figura 2-24.** Densidad de células del pavimento del haz y envés de hojas en dos estadios del desarrollo. Hojas procedentes de plantas de MM control y plantas homocigotas *CHIOx* y *CHI/FNSox* cultivadas en verano. H3: tercera hoja contando desde el ápice, H8: octava hoja contando desde el ápice. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre genotipos para cada estadio y cara de la hoja ( $p \leq 0,05$ ).

La cantidad de agua en las hojas y el tallo se determinó mediante las medidas de peso fresco, peso seco y del contenido de agua en los diferentes tejidos (Figura 2-25). En cuanto a las medidas realizadas en hoja, las plantas MM presentaron un número significativamente inferior al de las plantas transgénicas, de las cuales, las plantas *CHIOx* presentaron una menor cantidad de hojas que las *CHI/FNSox* sin llegar a ser estadísticamente diferente. Las medidas de peso seco de las plantas *CHI/FNSox* fueron las que tomaron los valores más bajos. Esta disminución unida a que fueron las plantas que mostraron un mayor número de hojas por planta hacen que no haya diferencia en el contenido de agua total. Con respecto al tallo, sólo se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de contenido de agua, siendo las plantas genéticamente modificadas las que presentaron los valores más bajos.



**Figura 2-25.** Peso fresco y seco y contenido de agua de hoja y tallo de plantas de MM control y plantas homocigotas *CHIox* y *CHI/FNSox* cultivadas en verano. Se incluye también el número de hojas por planta. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

### Relación entre la ruta de los flavonoides y el desarrollo y la calidad del fruto

La modificación de la ruta de biosíntesis de los flavonoides afectó a la maduración y a diferentes parámetros que determinan la calidad del fruto. Con respecto a la maduración, se vio cómo la sobreexpresión tanto de *PhCHI* como la de *PhCHI* junto con *GhFNS*, afectó a dicho proceso de manera que en ambos casos se vio adelantado. Estudios realizados en diferentes especies (manzana, tomate o fresa), han demostrado cómo el ABA promueve la biosíntesis de antocianinas y compuestos fenólicos, aumenta la actividad de PAL, CHS y mejora la producción de etileno (fitohormona responsable de la maduración de los frutos y de la senescencia de los tejidos) (McGlasson *et al.*, 1978; Jiang y Joyce, 2003; Mou *et al.*, 2015). Además del papel regulador predominante del etileno, el ABA también tiene una función importante en el control de la maduración del fruto climatérico (Mou *et al.*, 2015). Puede actuar como un inductor en el inicio de la maduración desencadenando la expresión de genes independientes del etileno, tomando éste importancia en la regulación de etapas posteriores en la maduración (Zhang *et al.*, 2009a, b). Un estudio realizado en tomate donde se llevó a cabo la supresión del gen que cataliza el primer paso de la ruta de biosíntesis del ácido abscísico (*NCEDI*) provocó una disminución de la expresión de algunos genes de la pared celular relacionados con la maduración, como son poligalacturonasa, pectinmetilesterasa o xiloglucan-endotransglicosilasa, provocando un aumento en la vida útil del fruto (Sun *et al.*, 2012). Por otro lado, en *A. thaliana* se han definido fenotipos semejantes entre los mutantes de *aba* y los mutantes de cutícula *bdg* y *lacs2* donde las mutaciones llevaron consigo un aumento de la permeabilidad cuticular (L'Haridon *et al.*, 2011). La pérdida de agua de los frutos es consecuencia de la respiración de los frutos y la difusión de moléculas de agua a través de la cutícula (Lara *et al.*, 2014). Pero no toda la pérdida de agua es atribuible a la cutícula ya que otros aspectos como la madurez de los frutos, las condiciones ambientales o la firmeza de sus paredes celulares también contribuyen a la misma. De esta manera, el adelanto en la maduración de los frutos y el aumento del flujo de agua que se observó en la vida poscosecha con la modificación de la ruta de los flavonoides en el presente capítulo pudo ser debida a que la sobreexpresión de los genes de petunia y gerbera en tomate implicaría un

aumento de ABA y éste produciría bien la activación de la biosíntesis de etileno, bien la modificación de la expresión de algunos genes involucrados en la maduración del fruto o de la síntesis de cutícula.

La dureza, además de estar relacionada con la vida poscosecha, es junto con el color uno de los caracteres más importantes en la calidad externa del fruto, ya que es el primer aspecto que los consumidores evalúan (Simonne *et al.*, 2007). La sobreexpresión de *PhCHI* y *PhCHI/GhFNS* llevó asociado un cambio en el color del fruto virando su color al rosa (Figura 2-5). Este cambio en el color con respecto al rojo que presentaron los frutos MM se debió a una disminución de la luminosidad ( $L^*$ ), de la saturación ( $C^*$ ) y del tono ( $H^\circ$ ). Así, en *CHIox* y *CHI/FNSox* las disminuciones de  $L^*$  y  $C^*$  del fruto completo se debieron a las disminuciones de estos parámetros bien de la cutícula o bien del mesocarpo. En el caso de las variaciones en cuanto al tono, valores más bajos de  $H^\circ$  observados en el fruto indican un tono más rosa debido a la disminución de la cantidad de chalconaringenina (pigmento de color amarillo-anaranjado) por el desplazamiento de la ruta hacia las flavanonas y flavonas de manera similar a lo que ocurre en los frutos que tienen silenciado el gen *CHS* (España, 2012). El agrietado es otro de los caracteres importantes en cuanto a la calidad externa del fruto se refiere que es evaluado por los consumidores. En el agrietado influyen tanto la cantidad de cutícula como de fenoles ya que modifican las propiedades mecánicas de la cutícula (Domínguez *et al.*, 2009; Domínguez *et al.*, 2012; España, 2012). En nuestro caso, las plantas transgénicas presentaron mayor agrietado que las plantas control, siendo las *CHI/FNSox* las que presentaron un mayor índice y severidad. Los frutos *CHI/FNSox* presentaron los valores más altos en cuanto a cantidad, grosor y grado de invaginación de la cutícula, sin embargo, fueron los que presentaron una menor cantidad de fenoles. De igual manera, frutos cuyas cutículas presentaron una disminución en cantidad de fenoles debido al silenciamiento del gen *CHS* presentaron un aumento notable del microagrietado (España *et al.*, 2012).

Según la bibliografía, la calidad interna del fruto, concretamente el sabor, puede venir determinado por el cultivar considerado, el grado de madurez y las condiciones ambientales (Tandon, 2000; Gautier *et al.*, 2008). Con respecto a las condiciones ambientales, hay trabajos realizados en tomate donde se estudió la variación de la calidad interna del fruto con la radiación solar (Gautier *et al.*, 2008; España, 2012). En estos estudios se observó una

disminución de los flavonoides y un aumento del ácido cafeico en los frutos madurados en oscuridad. Además, se relacionó el aumento de la acidez en los frutos tapados con la acumulación de precursores en la ruta de síntesis de los flavonoides, los ácidos cinámicos (cafeico, ferúlico y el *p*-cumárico), que tendría lugar por la inhibición parcial de esta ruta en respuesta a la oscuridad. Por otro lado, Adato *et al.* (2009) identificaron y cuantificaron en la piel de frutos transgénicos *35S:amiR-SIMYB12* y en frutos ‘Ailsa Craig’ con la mutación y varios componentes como la chalconaringenina y el ácido di-cafeoilquínico III. Así, en los genotipos con una disminución parcial (frutos *35S:amiR-SIMYB12*) o total (mutante y) de la cantidad de chalconaringenina también se observó un aumento del ácido di-cafeoilquínico III comparado con el silvestre ‘Ailsa Craig’. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo que indicaron un aumento de acidez en los genotipos *CHIox* y *CHI/FNSox* los cuales presentaron una menor cantidad de chalconaringenina con respecto a MM.

La relación entre la fertilidad del polen y los flavonoides la establecieron por primera vez Coe *et al.* en 1981 en maíz. Análisis posteriores de mutantes de CHS en maíz y petunia revelaron que el polen deficiente en flavonoides, aunque viable, no produjo un tubo polínico funcional (Mo *et al.*, 1992; Taylor y Grotewold, 2005). Por otro lado, estudios realizados en mutantes *tt4* de *A. thaliana* (mutantes del gen *CHS* deficientes en flavonoides) mostraron que estas plantas eran fértiles, aunque vieron reducido la cantidad de semillas producidas y la germinación *in vitro* del polen (Ylstra *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1996; Taylor y Grotewold, 2005). Al igual ocurre en nuestro trabajo, donde se observó una disminución en la cantidad y viabilidad de polen y en la cantidad de semillas en las plantas que tienen modificada genéticamente la ruta de los flavonoides.

### **La modificación de la ruta de biosíntesis de flavonoides afectó al tamaño celular**

La sobreexpresión de los genes de petunia y gerbera de forma conjunta llevó asociada un aumento del tamaño celular (tanto en área celular como en longitud tangencial de la célula, lo que implicó que las células presentasen una forma alargada) durante el desarrollo de fruto mientras que la sobreexpresión de *PhCHI* llevó asociada una reducción de la longitud tangencial y un aumento de la longitud radial de la célula lo cual determinó la forma redondeada que presentaron. Estas variaciones en el tamaño y la forma

celular fueron compensadas con el número de células por unidad de superficie lo cual provocó que el tamaño final del fruto no se viese afectado. En la hoja se observó un comportamiento similar, de manera que las plantas *CHI/FNSox* presentaron una menor densidad de células del pavimento mientras que *CHlox* mostraron una mayor densidad durante todo el desarrollo del fruto. Además, *CHI/FNSox* presentó una mayor superficie foliar y un mayor número de hojas por planta y *CHlox* tuvo unas flores de menor tamaño.

España *et al.* (2014b) ya observaron en tomate un menor tamaño de las células del epicarpo tras el silenciamiento transitorio durante la maduración de la *CHS* pudiendo establecer una relación entre la reducción drástica de la síntesis de flavonoides con la disminución del tamaño celular. En la bibliografía se encuentran varios trabajos en los cuales se ha establecido una asociación entre los flavonoides y el tamaño celular y de órganos, postulando la posibilidad de que dichos compuestos intervengan en la regulación del tamaño celular mediado por auxinas (Ringli *et al.*, 2008; Laffont *et al.*, 2010). Además, es conocido cómo diversos flavonoides, entre ellos la quercetina y el kaempferol, pueden modular el transporte polar de auxinas *in vivo* (Murphy *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001; Buer y Muday, 2004; Peer y Murphy, 2007; Buer *et al.*, 2013). Las auxinas son sustancias orgánicas que promueven la división y elongación celular bien a través de la inducción de enzimas hidrolíticas que rompen la pared celular (Rayle y Cleland, 1992) o bien induciendo el complejo TARGET OF RAPAMYCIN (TOR) (Henriques *et al.*, 2014). TOR es una proteína kinasa altamente conservada que está presente en levaduras, animales y plantas (Bögre *et al.*, 2013). En levaduras y mamíferos, TOR forma parte de dos complejos multiproteicos, TORC1 y TORC2, pero en plantas sólo se han identificado los componentes del complejo TORC1 (John *et al.*, 2011; Henriques *et al.*, 2014). Recientemente se ha ligado el complejo TOR en plantas con las rutas de señalización hormonal y por nutrientes en el control del crecimiento y desarrollo (Bögre *et al.*, 2013; Henriques *et al.*, 2014). De esta manera, el incremento en la cantidad de quercetina y kaempferol en el fruto de tomate a consecuencia de la sobreexpresión de *PhCHI* podría llevar consigo la inhibición del transporte polar de auxinas y consecuentemente, bien se reduciría la extensibilidad de las paredes celulares, lo que implicaría una menor elongación celular y un menor crecimiento del órgano en cuestión bien afectaría a la regulación del complejo TOR reduciendo la división y elongación celular. Sin embargo, los

frutos *CHI/FNSox* mostraron un comportamiento contrario, presentando en general un aumento del tamaño celular y del órgano, a excepción de la altura de la planta. Esto podría ser como ya se ha visto en el mutante *rol-1* de *A. thaliana* (Ringli *et al.*, 2008) que la modificación en el tamaño y la forma celular asociada a cambios en el perfil de flavonoles estuviese regulado por un mecanismo independiente al de las auxinas. Por otro lado, hay estudios realizados en mutantes de *A. thaliana* que han demostrado la alteración de las densidades tanto de estomas como de tricomas pueden resultar de la modificación en la biosíntesis de ceras cuticulares o en los flavonoides, sugiriendo así que la variación de la estructura y/o fisiología de la cutícula induce fenotipos secundarios (Gray *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2011; Nadakuduti *et al.*, 2012). En nuestro estudio se observó un aumento en cuanto a cantidad de ceras presentes en la cutícula del fruto con la modificación de la ruta de los flavonoides. De manera similar, podría estar pasando en la hoja y así, una modificación en las ceras de la cutícula de la hoja podría explicar también las variaciones en cuanto a las células epidérmicas.

### **La sobreexpresión de *PhCHI* y *GhFNS* afectó a la composición y propiedades de la cutícula del fruto**

La cutícula del fruto de tomate se vio afectada por la sobreexpresión de los genes de petunia y gerbera en cuanto a la morfología y composición química, que a su vez se asociaron con cambios en las propiedades mecánicas. En cuanto a los cambios en la morfología, se observó que la sobreexpresión génica aumentó el grosor y el grado de invaginación de la cutícula, siendo dicho aumento mayor en el caso de *CHI/FNSox*. Estos resultados son contrarios a los obtenidos en un estudio en tomates con la ruta de flavonoides modificada por el silenciamiento mediado por virus del gen *CHS*. En este estudio no se observaron diferencias en cuanto a grosor entre las cutículas de frutos silenciados y de no silenciados y el grado de invaginación se vio reducido en los frutos donde los niveles de fenoles eran menores (España *et al.*, 2014b). Esto puede estar justificado ya que el silenciamiento llevado a cabo por virus se realizó en un estadio avanzado del desarrollo a diferencia del caso de la sobreexpresión de los genes de petunia y gerbera, donde la modificación de la ruta está desde el inicio del desarrollo.

En el estudio de la cantidad de cutícula y de sus componentes se observaron diferencias entre las dos temporadas en las que se recolectó

material. La disminución observada en las cantidades de la cutícula y de sus componentes en la temporada de invierno con respecto a las observadas en verano eran las esperadas por el efecto de la menor radiación solar en la temporada de invierno (Domínguez *et al.*, 2012). En ambas temporadas se observó un aumento tanto en la cantidad de cutícula como de sus componentes, cutina, polisacáridos y ceras en las plantas transgénicas con respecto a su control. Estudios previos en los que se disminuyó la cantidad de fenoles en la cutícula mediante diferentes métodos no mostraron una relación entre la cantidad de fenoles y la cutícula o sus componentes (España *et al.*, 2012; España *et al.*, 2014b). Sin embargo, en otro estudio realizado con mutantes *tt4* y *tt5* de *A. thaliana* mostraron variaciones en cuanto a la cantidad de ceras con respecto al silvestre. *TT4* es un gen codificante para CHALCONA SINTASA y *TT5* codifica para CHALCONA ISOMERASA. En los mutantes *tt5* se observó una disminución del 75% en la cantidad de ceras con respecto al silvestre mientras que en los mutantes *tt4* o en los que portaban tanto la mutación *tt4* como *tt5* se observaron valores similares al silvestre en cuanto a cantidad de ceras. Por tanto, se concluyó que la acumulación de chalconaringenina debida a la mutación *tt5* era la responsable de la reducción de las ceras cuticulares (Bird *et al.*, 2013, comunicación a congreso). Estos resultados concuerdan con los mostrados en el presente capítulo, donde la sobreexpresión de los genes *PhCHI* y *PhCHI/GhFNS* hace disminuir de manera notable la cantidad de chalconaringenina en la piel del fruto pudiendo estar relacionada esta disminución con el aumento en la cantidad de ceras en cutícula. En el estudio llevado a cabo por España *et al.* (2014b) se observó una disminución de todos los componentes cuticulares en los frutos silenciados con respecto a los no silenciados, de manera paralela, en nuestro estudio se observó un aumento de dichos componentes en los frutos *CHIox* y *CHI/FNSox*. Por tanto, podemos pensar que la variación en la cantidad de chalconaringenina podría afectar no sólo a la acumulación de ceras, como ya apuntaron Bird *et al.* (2013), sino que también afectaría a la acumulación de los otros componentes cuticulares (cutina y polisacáridos) y por tanto a la cantidad total de cutícula. El aumento observado en el índice de esterificación de las cutinas de estadios P y RM en los frutos que sobreexpresan los genes *PhCHI* y *PhCHI/GhFNS* se debe a la correlación negativa descrita entre la cantidad de compuestos fenólicos incorporados durante el periodo de maduración del fruto y el grado de esterificación de la cutina (España *et al.*, 2014).



Como ya se ha comprobado en otros estudios realizados en tomate con variaciones en cantidad de flavonoides, las diferencias en la composición de la cutícula llevaron relacionados cambios en las propiedades biomecánicas (Bargel y Neinhuis, 2004; Saladié *et al.*, 2007; Adato *et al.*, 2009; Domínguez *et al.*, 2009). Estos estudios tienen en común la disminución en la cantidad de fenoles, sin embargo, difieren en la cantidad de los demás componentes que conforman la cutícula. En ellos se observó una modificación en el módulo elástico que determina la rigidez de la cutícula, el esfuerzo de fractura, la deformación máxima y/o la pendiente de la fase viscoelástica que determina la capacidad de deformación de la cutícula. En el caso de la sobreexpresión de *PhCHI* y *GhFNS* se observó una disminución de la rigidez durante todo el desarrollo del fruto además en los estadios VM, P y RM se alargó tanto la fase elástica como la viscoelástica y aumentó la deformación máxima. La cutina es el principal responsable del comportamiento viscoelástico de la cutícula así, el aumento de la cantidad de este componente en los frutos transgénicos explicaría el aumento de la fase viscoelástica observada. Los polisacáridos y las ceras intracuticulares actúan modificando las propiedades mecánicas aumentando la rigidez y el esfuerzo de fractura (López-Casado *et al.*, 2007; Petracek y Bukovac, 1995; Khanal *et al.*, 2013; Tsubaki *et al.*, 2013). Además, los polisacáridos alteran la fase elástica y disminuyen la deformación máxima. Por otro lado, se ha visto en tomate que los flavonoides son responsables de la longitud de la fase elástica, favorecen la rigidez y el esfuerzo de fractura y reducen la deformación máxima apuntando a que el efecto de los flavonoides es más significativo que el de los polisacáridos, a pesar de ser este compuesto más abundante, y las ceras (España, 2012). Por todo esto, la disminución observada en la rigidez y en el esfuerzo de fractura y el aumento de la deformación de las cutículas de los frutos transgénicos podrían atribuirse a la disminución de la cantidad de fenoles apoyando la idea de que estos compuestos tienen en el fruto de tomate un efecto más significativo que los polisacáridos y las ceras intracuticulares.

### **La sobreexpresión de los genes *PhCHI* y *GhFNS* no afectó a la expresión de genes de la ruta de síntesis de la cutícula**

Una vez conocidas las diferencias en la composición de la cutícula y con el objetivo de saber cómo la sobreexpresión de los genes *PhCHI* y *PhCHI/GhFNS* afectó a la expresión génica de la ruta de biosíntesis de

flavonoides y de la ruta de síntesis de cutícula y poder establecer así una relación entre ellas se seleccionaron genes estructurales y factores de transcripción claves de ambas rutas y se midió su expresión. Los resultados en cuanto a la expresión de genes clave de la ruta de biosíntesis de los flavonoides mostraron una disminución en la expresión de *CHS1*, *CHS2* y *PAL5* en los frutos transgénicos con respecto al control MM. Sin embargo, los genes *PAL6* y *PAL4* mostraron un aumento considerable, sobre todo en el estadio pintón. Un análisis de Norther realizado a partir de la piel de frutos transformados con el gen *PhCHI* ya mostró bajos niveles de *chi* con respecto al control durante todo el desarrollo del fruto (Muir *et al.*, 2001). Con estos resultados se postuló que el mecanismo regulador por el cual el ARNm CHI conlleva un aumento en la cantidad de flavonoides puede ser o bien porque la actividad de esta enzima representa el único paso limitante o bien porque el incremento del ARNm de CHI podría estar provocando cambios en la actividad de otras enzimas de la ruta (Burbulis y Winkel-Shirley, 1999; Muir *et al.*, 2001). Esto último explicaría los cambios observados en la expresión génica. Además, la reducción en la expresión de los genes *CHS* se ajusta a la disminución de chalconaringenina observada en la piel de los frutos *CHIOx* y en los *CHI/FNSox* (Muir *et al.*, 2001; Schijlen *et al.*, 2006).

En relación a la expresión de los genes estructurales del metabolismo de la cutícula no se obtuvieron los resultados esperados conforme a las diferencias observadas en cuanto a cantidad de cutícula y de sus componentes. A pesar de que dichas cantidades aumentaron en los frutos transgénicos con respecto al control, no se vio un aumento en la expresión de los genes de síntesis. El análisis de expresión de los genes relacionados con la deposición de cutina *CUS1* y *GDSL* determinó que son genes de estadios tempranos del desarrollo del fruto (VI y VM). Sin embargo, la modificación de la ruta de los flavonoides llevó asociada una disminución en la expresión de ambos genes en los frutos transgénicos con respecto al control, salvo en el estadio VM donde en los frutos *CHI/FNSox* aumentó levemente la expresión de *GDSL*. Por tanto, estos niveles de expresión no explicarían el aumento en la cantidad de cutina observada en los frutos modificados genéticamente. De igual modo, la expresión de *BDG* se vio reducida en los frutos de sobreexpresión con respecto al control MM. En el caso de *CHIOx* sólo se observó reducción de la expresión en el estadio VI mientras que en *CHI/FNSox* la expresión se vio reducida desde el inicio del desarrollo hasta alcanzar el estadio P, siendo más notable en el estadio VI. Si bien la bibliografía apunta que *BDG* es un gen

relacionado con la biosíntesis de cutícula y deposición de cutina y cuya pérdida de función en *A. thaliana* lleva consigo un aumento en la cantidad de cutina y de ceras (Kurdyukov *et al.*, 2006), aunque poco probable, la disminución de la expresión de este gen al inicio del desarrollo del fruto de tomate podría ser suficiente y estar relacionada de alguna manera con el aumento en cuanto a cutina y ceras se refiere. En cuanto a los genes *CER6* y *CER1-like* relacionados con la composición de ceras cuticulares (Vogg *et al.*, 2004; Leide *et al.*, 2007; Mintz-Oron *et al.*, 2008) sólo se observó un aumento en la expresión en la cutícula de los frutos *CHIox* de *CER6* en el estadio RM y de *CER1-like* en el estadio VM no pudiendo ser estos niveles los responsables del incremento de ceras observado durante todo el desarrollo en dicho genotipo. En el caso de las cutículas de los frutos *CHI/FNSox* la expresión de estos genes siempre se vio reducida, por lo tanto, debe haber otro gen responsable en tomate que justifique el aumento de las ceras cuticulares. Estudios relacionados con el silenciamiento de este transportador ABCG32/PEC1 en *A. thaliana* llevaron asociada una disminución en la cantidad de monómeros C16 afectando así la permeabilidad (Bessire *et al.*, 2011; Fabre *et al.*, 2015). El aumento observado en el estadio VI de los frutos *CHIox* concuerda con los resultados del mutante de *A. thaliana* *pec1* justificando así el aumento de los monómeros C16 en fruto de tomate. Se podría pensar que al inicio del desarrollo hay una alta expresión y los transportadores quedan de reservorio durante el resto del desarrollo. Sin embargo, esto es difícil que esté ocurriendo en los frutos *CHI/FNSox* ya que el aumento en la expresión del transportador ABCG32 en las primeras etapas, aunque superior, no es tan diferente del control.

En cuanto a los citocromos P450, *CYP86A68* y *CYP86A69*, son genes implicados en la hidroxilación de ácidos grasos y por tanto la biosíntesis de cutina (Shi *et al.*, 2013; Lashbrooke *et al.*, 2015) *CYP86A69* podría estar relacionado con el aumento en la cantidad de cutina en el estadio VI de los frutos *CHIox* mientras que el gen *CYP86A68*, sería el responsable de dicho aumento en los estadios P y RM. Sin embargo, no se puede establecer ninguna relación entre la cantidad de cutina y la expresión de estos genes en el estadio VM, lo cual junto con las pequeñas diferencias observadas en expresión hacen dudar de que dichos genes tengan un papel en la biosíntesis de cutina e hidroxilación de los ácidos grasos en el fruto de tomate. En cuanto a la expresión de *EST1*, a pesar de que su función no se conoce, se ha visto sobreexpresado en los frutos que presentan la mutación y durante la

maduración (Adato *et al.*, 2009). El patrón de expresión que presentaron MM y *CHIox* fue similar al de *CHS2*, a excepción del estadio P, que, aunque se da un aumento en los niveles de expresión, éste no es tan notable y toma valores similares a los del estadio VI. Por el contrario, los frutos *CHI/FNSox* presentaron un patrón de expresión diferente con respecto a los otros dos genotipos, donde los niveles de expresión se mantuvieron constantes durante todo el desarrollo y al llevar al estadio RM se observó una disminución.

La reducción de los niveles de expresión de los factores de transcripción tipo AP2 implicados en la producción y deposición de ceras tampoco se pueden relacionar con el aumento en cantidad de estos compuestos en las cutículas de los frutos transgénicos. Esto puede deberse a que salvo *SHN3* que se encuentra en todos los órganos, los demás son específicos de otros tejidos y órganos como son flores, raíces anteras y silicuas. Además, la expresión de los genes observada en este trabajo tampoco explicaría la elongación celular como se ha visto que ocurre en *A. thaliana* (Shi *et al.*, 2011). Por otro lado, la disminución en la expresión de *SHN* conlleva en *A. thaliana* fusión de órganos debido a una alteración en la cutícula y además una disminución en la cantidad de cutina. En tomate no se observó fusión de órganos y de manera contraria, se produjo un aumento en la cantidad de cutina. En cuanto a los factores de transcripción CD2, está descrito que es específico de epidermis y relacionado con la biosíntesis de cutina (Isaacson *et al.*, 2009; Nadakuduti *et al.*, 2012; Giménez *et al.*, 2015). Sin embargo, únicamente en el estadio P del fruto *CHI/FNSox* parecería que cumpliera dicha función.

Con respecto a los factores de transcripción MYB habría que destacar la expresión de *MYB41* siendo el único que presentó unos niveles de expresión acorde a las características de las plantas de sobreexpresión. Dicho gen está relacionado con las respuestas frente a un estrés presentando niveles bajos de expresión cuando dicho estrés no está presente (Cominelli *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha comprobado que la sobreexpresión de dicho gen en *A. thaliana* inducen cambios en el tamaño celular provocando incluso enanismo. Los resultados obtenidos mostraron un gran aumento en la expresión en los frutos *CHI/FNSox*. Este aumento en la expresión se puede deber a que la planta reconozca la variación en el perfil de flavonoides y los altos niveles de rutina, quercetina o luteolina los detecte como una señal de estrés, provocando así una respuesta. Además, la sobreexpresión de *MYB41* estaría

implicado en los cambios en cuanto a altura de la planta, presentando *CHI/FNSox* los valores más bajos.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## CAPÍTULO 3

# INFLUENCIA DEL NITRÓGENO EN LA SÍNTESIS DE CUTÍCULA Y EL METABOLISMO DE LOS FLAVONOIDES

*"La ciencia siempre vale la pena porque  
sus descubrimientos, tarde o temprano,  
siempre se aplican"*  
Severo Ochoa





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



### INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es uno de los nutrientes inorgánicos más importantes en las plantas, siendo un constituyente principal de ácidos nucleicos, proteínas, cofactores y metabolitos secundarios (Marschner, 1995; Iqbal *et al.*, 2013). Afecta a todos los niveles de la planta, desde el metabolismo a la asignación de recursos, el crecimiento y el desarrollo (Crawford, 1995; Marschner, 1995; Stitt y Krapp, 1999). El nitrógeno está disponible en el suelo en formas diversas y a menudo interconvertibles lo que, acompañado de la variedad de adaptaciones presentes en las plantas para optimizar su toma, hace que el estudio de la nutrición nitrogenada sea complejo (Näsholm *et al.*, 2009). La mayor parte de los estudios de nutrición vegetal han estado enfocados en las formas inorgánicas,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ , del nitrógeno, principalmente motivados por la presencia de nitrógeno inorgánico en muchos suelos de cultivo y por la abundancia de fertilizantes formulados con nitrógeno inorgánico (Näsholm *et al.*, 2009).

La intensificación de la agricultura en las últimas décadas no sólo ha favorecido el aumento de las cosechas, sino que ha ido acompañada de un gran incremento en el uso de fertilizantes, del 800% en el caso del nitrógeno (Foley *et al.*, 2011). De modo general, se estima que sólo el 40-50% del nitrógeno aportado como fertilizante es incorporado por las plantas (Sylvester-Bradley y Kindred, 2009), el resto pasa al agua y a la atmósfera, causando problemas de contaminación serios como consecuencia de la eutrofización de aguas y suelos, así como del aumento de gases de efecto invernadero (Gruber y Galloway, 2008; Pretty, 2008). La agricultura depende actualmente en gran medida de la producción de fertilizantes nitrogenados procedentes de la fijación de  $\text{N}_2$  mediante el proceso de Haber-Bosch (Matson *et al.*, 1997; Miller y Cramer, 2004). Se trata de un proceso energéticamente costoso ya que requiere elevadas condiciones de presión y temperatura. Todo ello ha conducido a una perturbación del ciclo global del nitrógeno que se considera la segunda causa del cambio climático global, sólo por detrás de la alteración del ciclo del carbono (Galloway *et al.*, 2008). Es por ello que actualmente se considera necesaria la identificación de estrategias que conlleven la reducción del aporte de nitrógeno en agricultura sin comprometer la cantidad o calidad de las cosechas (Witcombe *et al.*, 2008; Robertson y Vitousek, 2009).

En el caso concreto del tomate, Pill *et al.* (1978) observaron que el crecimiento y desarrollo de las plantas fue superior cuando el suministro de nitrógeno se aportó principalmente en forma de nitrato en vez de amonio, quizá debido a la mayor movilidad en suelo del primero (Miller y Cramer, 2004). El estudio de la tasa de absorción de nitrógeno a lo largo del ciclo de desarrollo de la planta de tomate mostró que sólo una parte del nitrógeno aportado en el abono era incorporada a la planta (Halbrooks y Wicox 1980; Bar-Yosef y Sagiv, 1982). Sin embargo, se observó que niveles altos de nitrógeno aumentaron la concentración de este elemento en hoja de tomate mientras que un aporte bajo disminuyó la cantidad de materia seca (Huett, 1986; Dumas *et al.*, 1993; Scholberg *et al.*, 2000; Le Bot *et al.*, 2001). Dumas *et al.* (1993) sugirieron una concentración de 6mM N como óptima para el crecimiento del tomate desde su germinación hasta la fase de floración. A pesar de ello, las recomendaciones generales de aporte de nitrógeno para el cultivo de tomate en invernadero siguen siendo a día de hoy entre 10 y 15 mM N (Letard *et al.*, 1995; Peet y Welles, 2005).

En *A. thaliana* se ha observado que la modificación del aporte de nitrógeno tiene un efecto sobre diversos genes del metabolismo primario y secundario (Scheible *et al.*, 2004) por lo que es posible que estas modificaciones en el desarrollo vegetativo desencadenen también cambios en el metabolismo del fruto de tomate (Bénard *et al.*, 2009). Varios trabajos han abordado el estudio de la calidad del fruto de tomate cultivado con distintas concentraciones de nitrógeno, por ejemplo, no se han detectado diferencias en el color de los frutos como consecuencia de un aporte diferencial de nitrógeno (Kaniszewski *et al.*, 1987; Warner *et al.*, 2004; Simonne *et al.*, 2007; Bénard *et al.*, 2009) pero sí se han descrito resultados variables con respecto a la firmeza del fruto (Kaniszewski *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 2007; Bénard *et al.*, 2009; Frías-Moreno *et al.*, 2014). De igual manera, los datos publicados respecto a la cosecha obtenida con distintas concentraciones de nitrógeno mostraron un aumento significativo en algunos casos (Warner *et al.*, 2004; Frías-Moreno *et al.*, 2014) mientras que en otros no hubo diferencias (Bénard *et al.*, 2009). Con respecto a la calidad interna, los resultados aportados en la bibliografía son variables, desde una disminución del contenido de ácidos con la disminución de nitrógeno (Wang *et al.*, 2007; Bénard *et al.*, 2009; Frías-Moreno *et al.*, 2014) a una disminución de la acidez con el aumento de nitrógeno (Simonne *et al.*, 2007). Por su parte, el contenido en sólidos solubles no se afecta de modo significativo (Simonne *et*

*al.*, 2007; Bénard *et al.*, 2009) aunque algunos autores han descrito un comportamiento variable dependiendo del genotipo o, incluso un aumento de dichos sólidos solubles al aumentar la cantidad de nitrógeno aportado (Wang *et al.*, 2007; Frías-Moreno *et al.*, 2014).

Zornoza y Esteban (1984) observaron que la modificación de la nutrición mineral aportada a las plantas de tomate durante su desarrollo afectó a la concentración y tipo de flavonoides acumulados en distintos tejidos. Como ya se ha mencionado en la *Introducción general*, son varios los trabajos que han demostrado que se produce un incremento en la concentración de flavonoides y fenilpropanoides así como de la expresión de genes involucrados en su síntesis asociado a la reducción del aporte de nitrógeno (Bongue-Bartelsman y Phillips, 1995; Stout *et al.*, 1998; Stewart *et al.*, 2001; Scheible *et al.*, 2004; Lea *et al.*, 2007; Lillo *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2009; Løvdaal *et al.*, 2010; Soubeyrand *et al.*, 2014). Entre los genes cuya expresión se ha visto modificada en condiciones de bajo nitrógeno están *PAL*, *CHS*, *F3H*, *FLS* y varios factores de transcripción tipo *MYB* y *bHLH*. Este efecto se ha detectado en varias especies entre las que cabe distinguir manzana (Tan, 1980), tabaco (Fritz *et al.*, 2006), *A. thaliana* (Scheible *et al.*, 2004; Lea *et al.*, 2007; Lillo *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2009; Nemie-Feyissa *et al.*, 2014), uva (Soubeyrand *et al.*, 2014) y tomate (Bongue-Bartelsman y Phillips, 1995; Stout *et al.*, 1998; Stewart *et al.*, 2001; Løvdaal *et al.*, 2010). Sin embargo, en la mayoría de estos trabajos se estudió el tejido vegetativo y el efecto del nitrógeno a los pocos días del cambio de la solución nutritiva (Tan, 1980; Bongue-Bartelsman y Phillips, 1995; Stout *et al.*, 1998; Scheible *et al.*, 2004; Fritz *et al.*, 2006; Lea *et al.*, 2007; Lillo *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2009; Løvdaal *et al.*, 2010; Nemie-Feyissa *et al.*, 2014). Sólo en tres casos se estudió el efecto del aporte diferencial de nitrógeno durante todo el periodo de crecimiento y fructificación (Stewart *et al.*, 2001; Benard *et al.*, 2009; Soubeyrand *et al.*, 2014). Así, en plantas de tomate se observó una relación inversa entre el aporte de nitrógeno y la cantidad de flavonoles en hoja (Stewart *et al.*, 2001), sin embargo, en fruto no hubo diferencias en la concentración de estos compuestos en el estadio rojo maduro, pero sí en verde maduro, donde aumentó con la disminución del aporte de nitrógeno (Stewart *et al.*, 2001). Por su parte, Bénard *et al.* (2009) demostraron que la rutina aumenta en el fruto de tomate al disminuir el aporte de nitrógeno, aunque no otros compuestos fenólicos. En uva, Soubeyrand *et al.* (2014) detectaron un

aumento en la concentración de antocianos en frutos procedentes de plantas cultivadas con menor concentración de nitrógeno. Asimismo, estudiaron los cambios durante el envero de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los flavonoides encontrando una relación inversa entre la expresión de varios de estos genes y el aporte de nitrógeno.



**Figura 3-1.** Cutículas aisladas de frutos de la entrada RIL115 de tomate cultivados con distintas concentraciones de nitrógeno. Fotografía Dra. E. Domínguez.

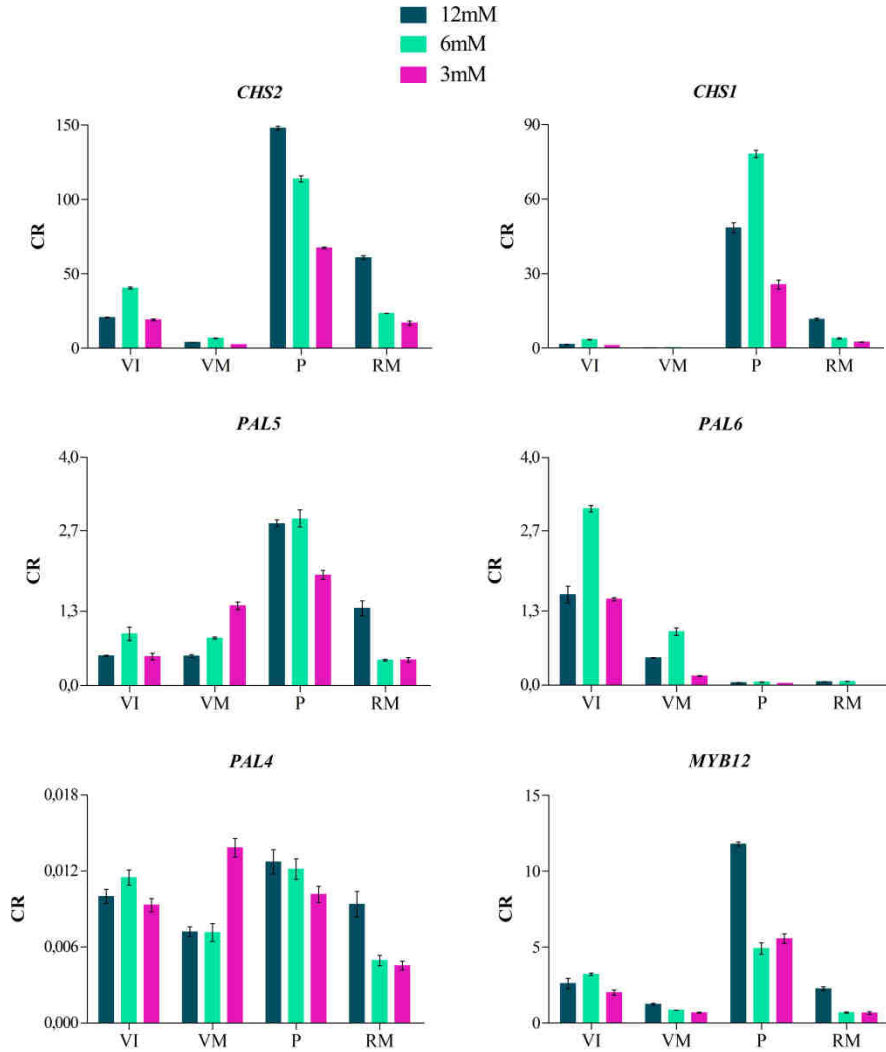
Resultados preliminares obtenidos en nuestro grupo de trabajo mostraron un aumento en el color de la cutícula aislada de frutos con la disminución del aporte de nitrógeno (Figura 3-1). Este aumento de color llevó asociado un incremento de 10 veces la cantidad de fenoles de la cutícula. Sin embargo, al haberse detectado en una línea RIL, la cual presenta poco color en la cutícula, se planteó la posibilidad de que este aumento de fenoles pudiera no ser tan significativo en tomates con cutículas coloreadas en maduración. Por ello, y dada la importancia de los fenoles en resistencia mecánica de la cutícula (Domínguez *et al.*, 2009; España *et al.*, 2014b) así como en el agrietado del fruto de tomate (España, 2012) se planteó el estudio de la influencia del nitrógeno sobre la cantidad de fenoles acumulados en la cutícula de frutos de tomate rojo y su posible influencia en diversos parámetros de calidad de fruto.

## RESULTADOS

### I. Expresión de genes del metabolismo de los flavonoides en fruto

Se determinó mediante RT-qPCR la expresión de varios genes del metabolismo de los flavonoides para determinar si el crecimiento de las plantas con distintos niveles de N afectó a su expresión. Para ello se seleccionaron los genes *CHS1* y *CHS2* que, de acuerdo con el capítulo 1 de la presente memoria, son los genes *CHS* que se expresan en fruto de modo significativo. Adicionalmente, se determinó la expresión del factor de transcripción *MYB12*, cuyo papel en la regulación de varios genes de la ruta de fenoles y flavonoides en fruto es conocida (Adato *et al.*, 2009; Ballester *et al.*, 2010), así como los genes *PAL* que, de acuerdo con la bibliografía y resultados previos del grupo, se expresan a lo largo del desarrollo del fruto de tomate (Bovy *et al.*, 2002; Adato *et al.*, 2009).

La Figura 3-2 muestra los resultados de expresión de estos genes a lo largo del desarrollo en los tres tratamientos de nitrógeno estudiados. El patrón de expresión a lo largo del desarrollo de los genes *CHS1* y *CHS2* fue similar al ya descrito en el capítulo 1 de la presente memoria esto es, un máximo de expresión en el estadio pintón seguido de una disminución en rojo maduro. En verde inmaduro se observó un nivel de expresión bajo, que disminuyó considerablemente en verde maduro. Con respecto a los tratamientos de nitrógeno, la expresión de *CHS2* disminuyó gradualmente desde un máximo a 12 mM N hasta el mínimo a 3 mM N en los estadios pintón y rojo maduro. Así, la expresión en pintón de *CHS2* en 12 mM N fue más del doble que la detectada a 3 mM N. En rojo maduro la expresión fue 2,5 veces superior en 12 mM N con respecto a 6 mM N mientras que a 3 mM N se detectó una reducción de 1,7 veces la expresión detectada a 6 mM N. En los estadios previos de verde inmaduro y verde maduro la expresión fue superior a 6 mM N con respecto a los otros dos tratamientos. En el caso de la *CHS1* la expresión fue superior en los frutos de plantas cultivadas con 6 mM N en comparación los otros tratamientos. En pintón estas diferencias fueron superiores, concretamente 1,6 veces superior a la expresión en 12 mM N y tres veces superior respecto a 3 mM N. Este comportamiento se observó en todos los estadios salvo en rojo maduro donde hubo una disminución gradual en la expresión desde 12 mM N hasta 3 mM N.



**Figura 3-2.** Cantidad relativa (CR) de ARNm de los genes del metabolismo de los fenoles *CHS1*, *CHS2*, *PAL4*, *PAL5*, *PAL6* y *MYB12* medidos en epicarpo de frutos recolectados en cuatro estadios del desarrollo y procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. *CHS*: *CHALCONA SINTASA*, *PAL*: *FENILALANINA AMONIO LIASA*. VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.

En el caso de los genes *PAL*, se observó que *PAL5* presentó un patrón de expresión con un máximo en pintón y valores más bajos y similares entre sí tanto en estadios iniciales como en rojo maduro. La expresión de *PAL6* fue superior en verde inmaduro y disminuyó a lo largo del desarrollo y

maduración del fruto. Finalmente, *PAL4* mostró una expresión baja y similar a lo largo del desarrollo. Respecto a los tratamientos de nitrógeno, en *PAL5* se observó una relación inversa en verde maduro entre la expresión del gen y la cantidad de nitrógeno del tratamiento que se modificó en los estadios posteriores del desarrollo. Así en pintón la expresión en 3 mM N disminuyó con respecto a los otros dos tratamientos mientras que en rojo maduro hubo un aumento en 12 mM N. En *PAL6* se observó una mayor expresión a 6 mM N con respecto a los otros dos tratamientos en los estadios verde inmaduro y verde maduro, pero no hubo diferencias apreciables durante la maduración. Por último, la expresión de *PAL4* mostró un aumento en 3 mM N en verde maduro y un aumento de 12 mM N en rojo maduro.

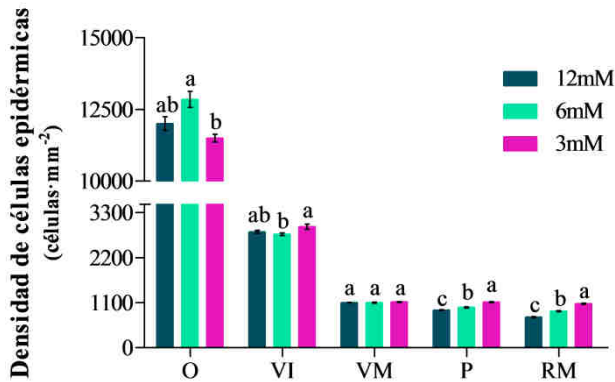
La expresión de *MYB12* disminuyó entre verde inmaduro y maduro para luego alcanzar su máxima expresión en pintón y volver a disminuir en rojo maduro, de manera equivalente a lo observado en *CHS1* y *CHS2*. A partir del estadio pintón se observaron diferencias en la expresión de *MYB12* asociadas a los tratamientos de nitrógeno. Si bien la expresión fue similar tanto en pintón como rojo maduro para 6 y 3 mM N, la expresión en 12 mM N fue más del doble que la de 6 mM N en pintón y más de 3 veces en rojo maduro.

## II. Desarrollo de la epidermis y la cutícula

El estudio del tamaño y forma de las células de la epidermis se realizó en dos fases: en primer lugar, se realizó una primera inspección de la superficie de los frutos, mediante microscopía electrónica de barrido, con la que se estimó el número de células por unidad de superficie. En segundo lugar, partiendo de los resultados obtenidos de la inspección de la superficie, se escogieron dos estadios del desarrollo, verde inmaduro y rojo maduro, en los que se midieron las dimensiones de las células epidérmicas.

La densidad de células epidérmicas disminuyó durante el desarrollo hasta alcanzar un mínimo en rojo maduro (Figura 3-3). En el ovario, el número de células en el tratamiento de 3 mM N fue significativamente inferior al de 6 mM N, mientras que el de 12 mM N mostró una densidad celular intermedia. En verde inmaduro la densidad de células fue superior en 3 mM N pero estas diferencias desaparecieron en verde maduro. A partir del inicio de la maduración y hasta rojo maduro se volvieron a observar diferencias significativas entre los tratamientos. En este caso una relación

inversa entre el número de células por unidad de superficie y la cantidad de nitrógeno del tratamiento. De esta forma, los frutos de plantas cultivadas con 12 mM N presentaron la menor densidad de células de la epidermis mientras que aquellos procedentes del tratamiento de 3 mM N fue significativamente superior a los otros dos.

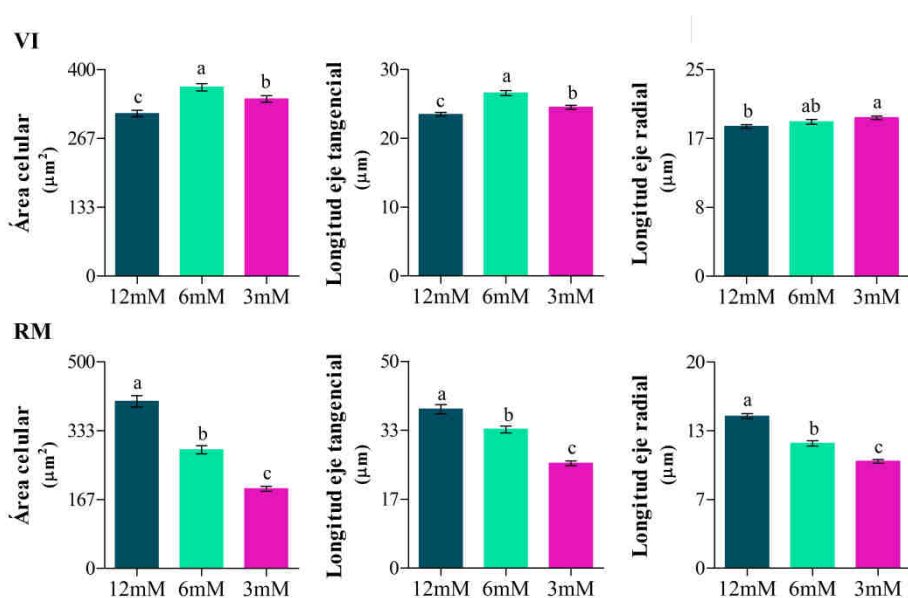


**Figura 3-3.** Densidad de células del epicarpo a lo largo del desarrollo del fruto de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. O: ovario, VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas dentro de cada estadio para los diferentes tratamientos ( $p \leq 0,05$ ).

La Figura 3-4 muestra el área y las longitudes tangenciales y radiales de las células epidérmicas en dos estadios del desarrollo. De acuerdo con la orientación de las muestras, en los cortes transversales se visualizó el eje tangencial, paralelo a la superficie, y radial, perpendicular a la superficie del fruto. En verde inmaduro las células epidérmicas mostraron un aspecto redondeado en todos los tratamientos (Figura 3-5 A,C,E). El área celular y eje tangencial fueron significativamente mayores en los frutos del tratamiento de 6 mM N siendo intermedias en el tratamiento de 3 mM N y significativamente menores a las anteriores en 12 mM N. Sin embargo, las diferencias en el eje radial sólo fueron significativamente distintas entre sí los tratamientos de 3 y 12 mM N. De tal manera que, a partir de la ratio entre los dos ejes, se puede indicar que las células de la epidermis de 3 y 12 mM N fueron ligeramente más redondeadas que las de 6 mM N. Al final de la maduración las células de la epidermis mostraron un aspecto mucho más alargado (Figura 3-5 B,D,F). En rojo maduro se observó una disminución



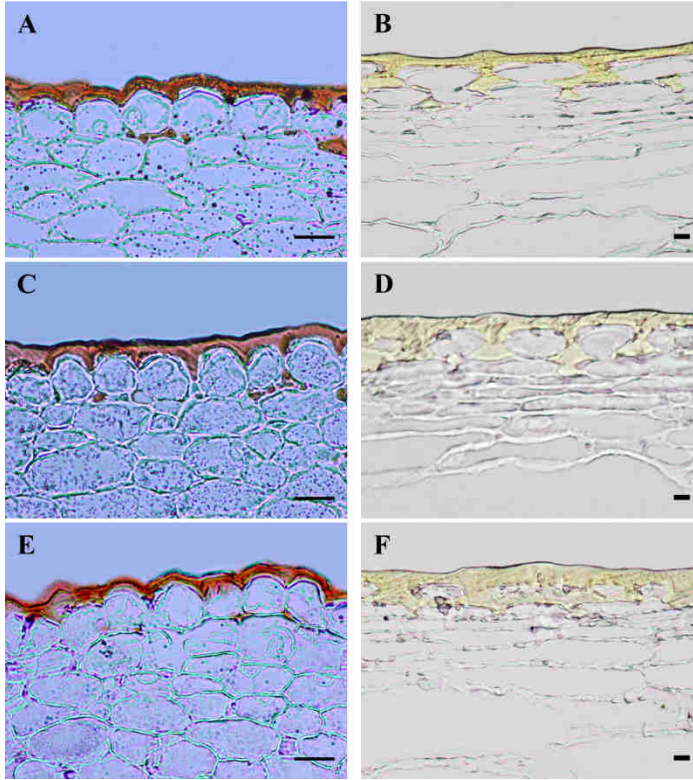
significativa del área y de los ejes tangencial y radial con la cantidad de N de los tratamientos. Así, las células de los frutos del tratamiento de 12 mM N fueron significativamente mayores al resto y las de 3 mM N significativamente menores a las demás. Estos datos concordaron con los observados en la Figura 3-3 donde los frutos de 3 mM N presentaron el mayor número de células por unidad de superficie y los de 12 mM N la menor densidad celular.



**Figura 3-4.** Tamaño de las células epidérmicas medido en dos estadios del desarrollo de frutos procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. En la fila superior se muestran los gráficos correspondientes al estadio verde inmaduro (VI) y en la inferior los de rojo maduro (RM). Los datos se representan como medias ± SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

En los cortes histológicos presentados en la Figura 3-5 se apreció que en verde inmaduro la cutícula tenía un grosor bastante homogéneo a lo largo de la superficie de las células de la epidermis (Figura 3-5 A,C,E) y apenas había empezado a recubrir las paredes anticlinales de las mismas. En rojo maduro el grosor de la cutícula aumentó considerablemente y recubrió total o parcialmente las paredes anticlinales y la pared periclinal interna (Figura 3-5 B,D,F). Adicionalmente se pudo observar que el grosor de la cutícula ya no era constante a lo largo de la célula, sino que aumentó hacia los bordes de las células. No se apreciaron diferencias a nivel de células de la hipodermis o

parénquima entre los distintos tratamientos de nitrógeno ni de número de capas de hipodermis para ninguno de los estadios estudiados.



**Figura 3-5.** Microfotografías de cortes histológicos de pericarpio de frutos de tomate en dos estadios del desarrollo procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. 12 mM N: A,B; 6 mM N: C,D; 3 mM N: E,F. Verde inmaduro: A,C,E; rojo maduro: B,D,F. Los cortes de VI están teñidos con Sudán IV para visualizar la cutícula. Barra: 25  $\mu$ m (A,C,E); 5  $\mu$ m (B,D,F).

Los valores de grosor y grado de invaginación de la cutícula se muestran en la Tabla 3-1. En verde inmaduro no hubo diferencias de grosor o invaginación de la cutícula entre los distintos tratamientos de nitrógeno. En rojo maduro, sin embargo, los frutos del tratamiento de 3 mM N presentaron una cutícula significativamente más delgada que los de 6 mM N, teniendo los de 12 mM N un valor intermedio. Con respecto a la invaginación ésta fue significativamente superior en los frutos de 3 mM N, intermedia en los de 6 mM N y los valores más bajos se observaron en 12 mM N.

**Tabla 3-1.** Grosor y grado de invaginación de la cutícula de fruto de tomate en dos estadios del desarrollo procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. Los valores de grado de invaginación están expresados en unidades arbitrarias. VI: verde inmaduro, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo estadio ( $p \leq 0,05$ ).

Estadio	Tratamiento	Grosor ( $\mu\text{m}$ )	Grado invaginación
VI	12 mM N	3,18 $\pm$ 0,07 a	0,27 $\pm$ 0,02 a
	6 mM N	3,30 $\pm$ 0,09 a	0,28 $\pm$ 0,02 a
	3 mM N	3,12 $\pm$ 0,06 a	0,26 $\pm$ 0,02 a
RM	12 mM N	5,47 $\pm$ 0,13 ab	0,95 $\pm$ 0,06 c
	6 mM N	5,83 $\pm$ 0,08 a	1,22 $\pm$ 0,05 b
	3 mM N	5,32 $\pm$ 0,12 b	1,35 $\pm$ 0,03 a

La Tabla 3-2 presenta los valores de cantidad de cutícula y de sus componentes en los distintos estadios del desarrollo estudiados. La cantidad de cutícula aumentó hasta alcanzar su valor máximo en rojo maduro en los frutos del tratamiento 6 mM N. Sin embargo, en los otros dos tratamientos, el incremento de la cantidad de cutícula cesó en pintón y hubo una disminución durante la maduración. Este mismo comportamiento se reflejó en la cantidad de cutina y polisacáridos, componentes mayoritarios de la cutícula. La cantidad de ceras aumentó durante la fase de crecimiento de fruto para luego disminuir durante la de maduración en los tres tratamientos. Por otro lado, la cantidad de fenoles aumentó progresivamente hasta alcanzar el máximo en rojo maduro. La comparación entre tratamientos mostró diferencias significativas para la cantidad de cutícula, cutina y polisacáridos en los estadios verde inmaduro y verde maduro que luego desaparecieron en el estadio pintón. En rojo maduro se vuelven a establecer diferencias significativas entre los tres tratamientos siendo 6 mM N superior, 3 mM N intermedio y 12 mM N inferior tanto para la cantidad de cutícula como de cutina y polisacáridos. En el caso de las ceras y fenoles se observó un aumento significativo en verde inmaduro para el tratamiento 6 mM N que posteriormente disminuyó en verde maduro. En maduración, la cantidad de ceras y fenoles fue significativamente superior en los tratamientos de 6 y 3 mM N con respecto al de 12 mM N.

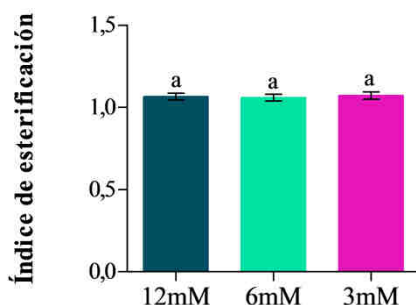
Con respecto a los porcentajes de los componentes, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos para la cutina, polisacáridos y ceras. Sin embargo, el porcentaje de fenoles sí varió entre tratamientos

durante la maduración. Así, las cutículas de 3 mM N registraron un porcentaje de fenoles significativamente superior al del resto de los tratamientos.

**Tabla 3-2.** Cantidad de cutícula y de sus principales componentes, cutina, polisacáridos, ceras y fenoles, de frutos en cuatro estadios de desarrollo procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. Los valores se expresan en  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Datos presentados como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo estadio ( $p \leq 0,05$ ).

	<b>12 mM N</b>	<b>6 mM N</b>	<b>3 mM N</b>
<b>Cutícula</b>			
VI	801,3 $\pm$ 45,7 b	960,3 $\pm$ 34,0 a	803,5 $\pm$ 32,7 b
VM	2363,8 $\pm$ 51,2 a	1998,0 $\pm$ 62,5 b	2199,4 $\pm$ 57,0 ab
P	2125,4 $\pm$ 49,7 a	2119,1 $\pm$ 52,1 a	2266,2 $\pm$ 57,7 a
RM	1577,7 $\pm$ 48,4 c	2122,7 $\pm$ 52,8 a	1767,3 $\pm$ 35,5 b
<b>Cutina</b>			
VI	591,2 $\pm$ 33,7 b	700,7 $\pm$ 35,5 a	585,2 $\pm$ 23,8 b
VM	1651,1 $\pm$ 35,7 a	1397,2 $\pm$ 66,9 b	1511,6 $\pm$ 39,2 ab
P	1469,9 $\pm$ 34,4 a	1463,0 $\pm$ 33,9 a	1595,9 $\pm$ 40,6 a
RM	1146,2 $\pm$ 35,2 c	1546,0 $\pm$ 50,8 a	1279,0 $\pm$ 25,7 b
<b>Polisacáridos</b>			
VI	192,3 $\pm$ 11,0 b	238,9 $\pm$ 12,1 a	200,9 $\pm$ 8,2 b
VM	638,2 $\pm$ 13,8 a	537,3 $\pm$ 25,7 b	615,8 $\pm$ 16,0 a
P	595,1 $\pm$ 13,9 a	603,1 $\pm$ 14,0 a	605,1 $\pm$ 15,4 a
RM	394,4 $\pm$ 12,1 c	530,7 $\pm$ 17,4 a	441,8 $\pm$ 8,9 b
<b>Ceras</b>			
VI	17,7 $\pm$ 1,0 b	20,6 $\pm$ 0,7 a	17,3 $\pm$ 0,7 b
VM	74,3 $\pm$ 1,6 a	63,5 $\pm$ 2,0 b	71,9 $\pm$ 1,9 a
P	60,4 $\pm$ 1,4 a	53,0 $\pm$ 1,2 b	65,2 $\pm$ 1,7 a
RM	37,0 $\pm$ 1,1 b	46,0 $\pm$ 1,5 a	46,5 $\pm$ 0,9 a
<b>Fenoles</b>			
VI	15,5 $\pm$ 0,2 c	20,3 $\pm$ 0,5 a	17,1 $\pm$ 0,1 b
VM	57,5 $\pm$ 0,9 a	42,8 $\pm$ 2,1 b	58,1 $\pm$ 0,8 a
P	79,9 $\pm$ 6,4 b	114,7 $\pm$ 4,4 a	117,1 $\pm$ 6,1 a
RM	109,2 $\pm$ 5,4 b	151,6 $\pm$ 3,7 a	140,1 $\pm$ 1,0 a

En el capítulo anterior se observó que la disminución dramática de los fenoles de la cutícula en maduración llevó asociada un aumento del índice de esterificación de la cutina. Sin embargo, la disminución de la cantidad de fenoles asociada a los tratamientos de nitrógeno no afectó al índice de esterificación de la cutina, el cual fue similar en todos los tratamientos (Figura 3-6).



**Figura 3-6.** Índice de esterificación de la cutina aislada de frutos rojo maduro procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

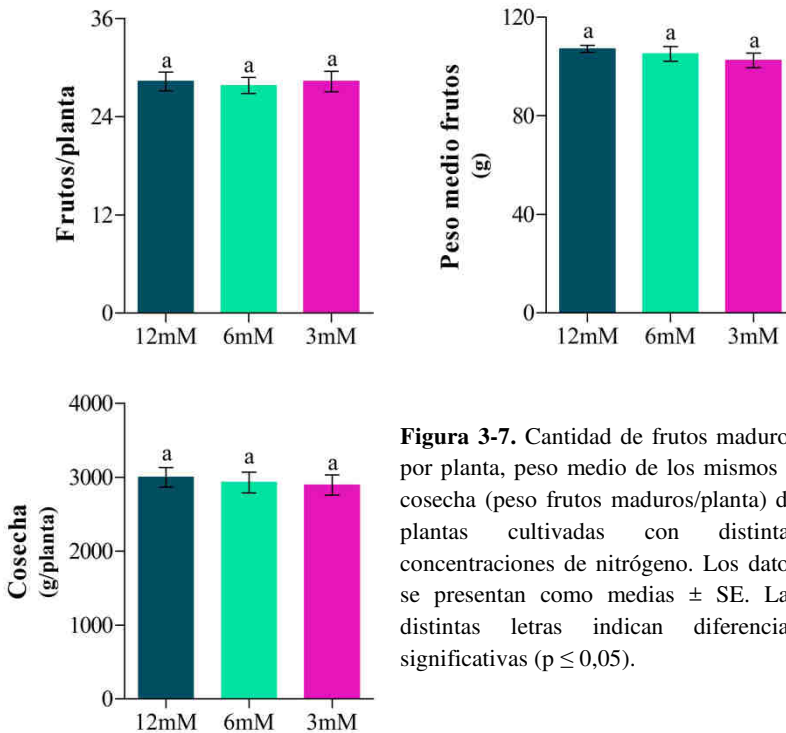
### III. Crecimiento y desarrollo del fruto

Se registró la evolución del tamaño de fruto a lo largo del crecimiento y maduración para los distintos tratamientos de nitrógeno (Tabla 3-3). La disminución de nitrógeno estuvo acompañada de diferencias significativas en el tamaño del ovario siendo los valores más bajos los de 3 mM N. Estas diferencias iniciales no se reflejaron, sin embargo, a lo largo del desarrollo del fruto donde el diámetro de los frutos fue similar entre los tratamientos con la excepción de verde maduro, en el que los frutos de 6 mM N mostraron puntualmente un mayor diámetro. Adicionalmente se estudió la evolución temporal del desarrollo. Así se pudo observar que más del 20% de los frutos de las plantas cultivadas con 3 mM N alcanzaron los estadios verde maduro y rojo maduro antes que aquellos procedentes de los otros tratamientos, en torno a una semana.

**Tabla 3-3.** Evolución del diámetro del fruto (mm) a lo largo del desarrollo en frutos procedentes de plantas cultivadas en distintas concentraciones de nitrógeno. O: ovario, VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada estadio ( $p \leq 0,05$ ).

Estadio	12 mM N	6 mM N	3 mM N
O	1,76 $\pm$ 0,02 a	1,64 $\pm$ 0,02 b	1,46 $\pm$ 0,02 c
VI	33,14 $\pm$ 0,93 a	34,98 $\pm$ 0,71 a	35,09 $\pm$ 0,84 a
VM	57,29 $\pm$ 1,17 a	58,31 $\pm$ 1,23 a	57,84 $\pm$ 0,97 a
P	61,41 $\pm$ 1,43 a	62,21 $\pm$ 1,02 a	61,00 $\pm$ 1,28 a
RM	62,85 $\pm$ 1,57 a	61,95 $\pm$ 0,93 a	62,00 $\pm$ 1,25 a

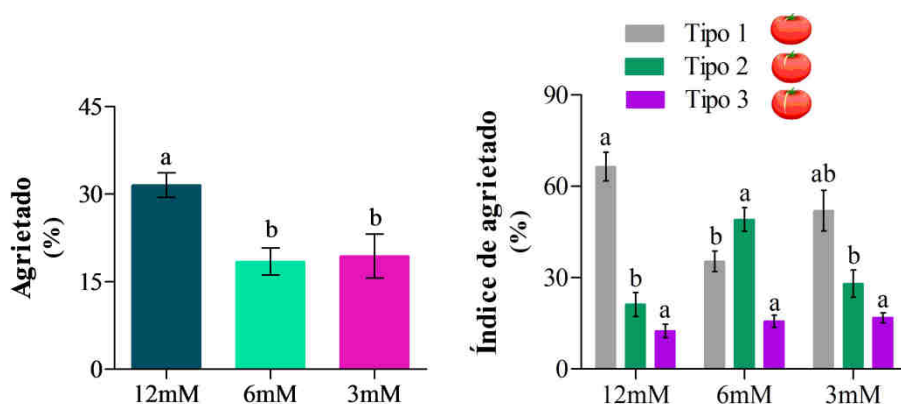
En relación con la cosecha no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguno de los parámetros estudiados (Figura 3-7). El número de frutos maduros por planta al final del ciclo, así como su peso medio y la cosecha fueron similares en las plantas cultivadas con los tres tratamientos de nitrógeno.



**Figura 3-7.** Cantidad de frutos maduros por planta, peso medio de los mismos y cosecha (peso frutos maduros/planta) de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

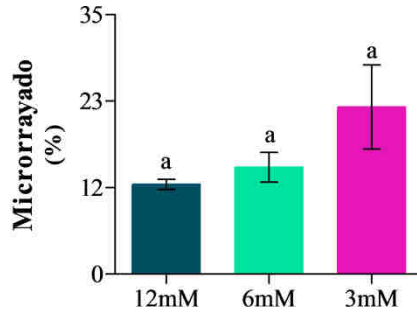
#### IV. Calidad del fruto

Los resultados de la evaluación del porcentaje de agrietado de fruto en los tres tratamientos se muestran en la Figura 3-8. Los frutos de las plantas cultivadas con 12 mM N presentaron una tasa de agrietado significativamente superior a los de los otros tratamientos, no observándose diferencias entre 6 y 3 mM N. La severidad del agrietado se evaluó empleando una escala arbitraria (Figura 3-8). Se observó que la mayoría del agrietado registrado fue de tipo 1, salvo en el tratamiento de 6 mM N en el que los tipos 1 y 2 fueron igualmente frecuentes. El agrietado tipo 1 representa la aparición de pequeñas grietas que quedan total o parcialmente cubiertas por el cáliz. El caso más severo de agrietado que se observó en los distintos tratamientos fue la aparición de grietas de un extremo a otro del fruto (tipo 3) no habiendo diferencias entre tratamientos.



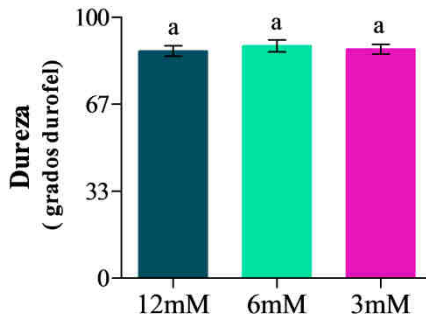
**Figura 3-8.** Porcentaje de agrietado total e índice de agrietado de frutos rojo maduro procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada tipo de agrietado ( $p \leq 0,05$ ).

En el caso del microrrayado no hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Figura 3-9). Si bien el promedio de microrrayado fue superior en el tratamiento de 3 mM N (22%), la variabilidad mostrada hizo que no fuera estadísticamente significativo del estimado en 12 y 6 mM (12 y 15%, respectivamente).



**Figura 3-9.** Porcentaje de microrrayado presente en frutos rojo maduro procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

La dureza de los frutos se evaluó en frutos rojo maduro que no presentaban grietas y se observó que los distintos tratamientos de nitrógeno no afectaron a este parámetro (Figura 3-10).

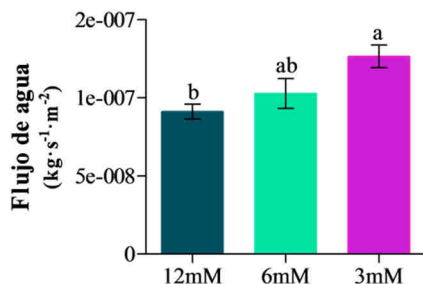


**Figura 3-10.** Dureza de los frutos rojo maduro procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

La transpiración de los frutos de los distintos tratamientos de nitrógeno en rojo maduro se evaluó mediante un ensayo de poscosecha en el que se simuló el almacenamiento en condiciones ambientales (Figura 3-11). La pérdida de agua de los frutos aumentó con la menor concentración de nitrógeno del

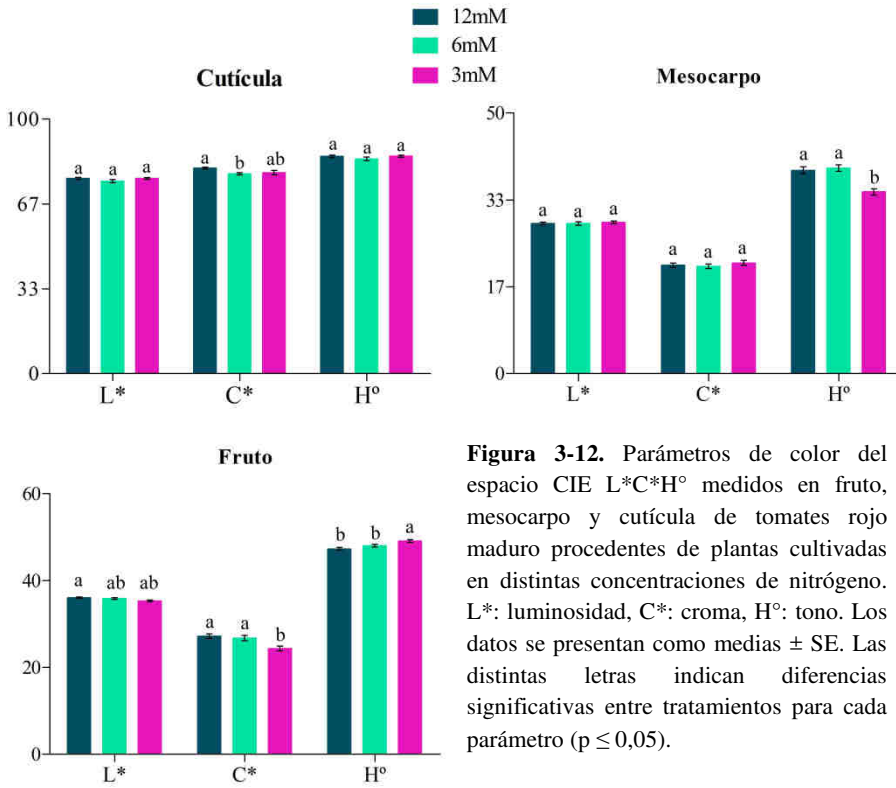


tratamiento. Así, frutos de plantas cultivadas a 3 mM N presentaron un mayor flujo de agua reduciendo así la vida poscosecha.



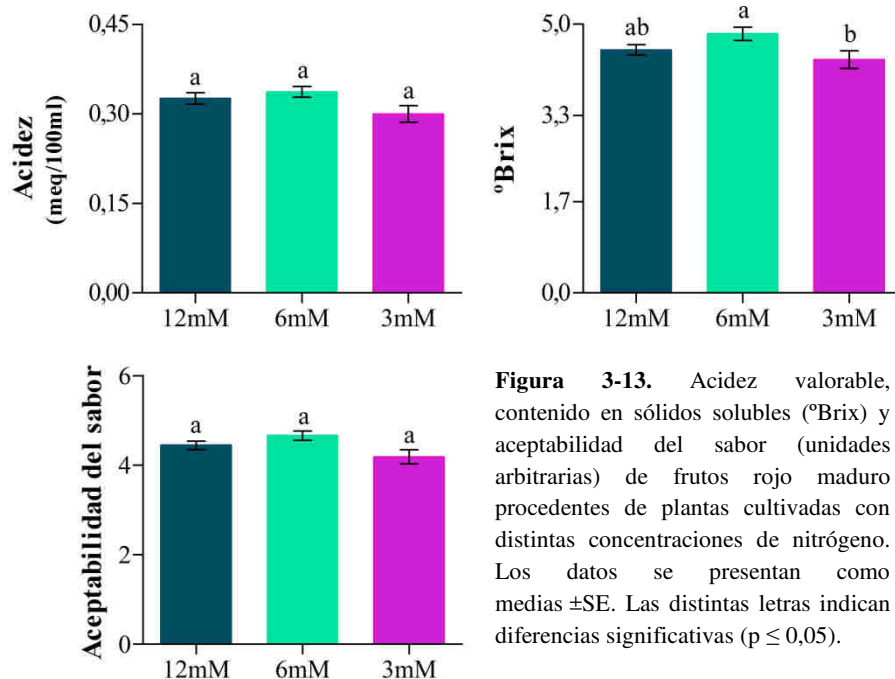
**Figura 3-11.** Transpiración, expresada como flujo de agua, de frutos rojo maduro durante la poscosecha. Frutos procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

El color se determinó en los frutos rojo maduro así como en las cutículas aisladas y en el mesocarpo para los diferentes tratamientos (Figura 3-12). Los valores de  $L^*$  fueron similares para los tres tratamientos tanto en fruto como en la cutícula y en la carne del fruto. En cuanto a  $C^*$ , la cromaticidad, ésta disminuyó en fruto con el contenido de nitrógeno de los tratamientos aunque sólo fue significativa en 3 mM N. Esta diferencia se debió al color de la cutícula y no del mesocarpo ya que éste no mostró diferencias para  $C^*$  entre los tratamientos. Sin embargo, sí hubo una disminución significativa de  $C^*$  en la cutícula de los frutos de los tratamientos de 6 y en menor medida de 3 mM N. Finalmente  $H^\circ$ , el tono, aumentó significativamente en los frutos de 3 mM N. En este caso, la diferencia en tono no fue reflejo de la cutícula, que no mostró diferencias entre los tratamientos, pero sí del mesocarpo, el cual mostró una disminución significativa en 3 mM N.



**Figura 3-12.** Parámetros de color del espacio CIE L\*C\*H° medidos en fruto, mesocarpo y cutícula de tomates rojo maduro procedentes de plantas cultivadas en distintas concentraciones de nitrógeno. L\*: luminosidad, C\*: croma, H°: tono. Los datos se presentan como medias ± SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada parámetro (p ≤ 0,05).

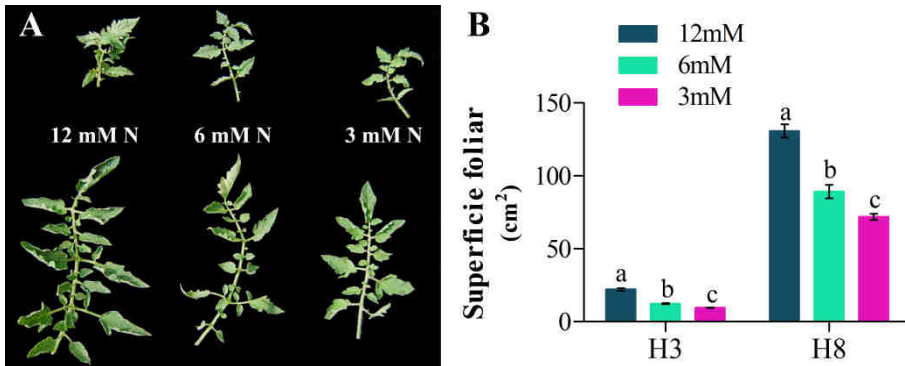
El sabor del fruto de tomate está determinado fundamentalmente por la acidez y la cantidad de sólidos solubles, lo que en conjunto puede determinar su aceptabilidad. No se observaron diferencias significativas en la acidez de los frutos procedentes de los distintos tratamientos de nitrógeno (Figura 3-13) aunque sí hubo una pequeña disminución significativa para los °Brix en el caso de 3 mM N. Aun así, esta diferencia no se reflejó en la aceptabilidad del sabor (Figura 3-13), determinada de acuerdo con la ecuación desarrollada por Malundo *et al.* (1995) para fruto de tomate.



**Figura 3-13.** Acidez valorable, contenido en sólidos solubles (°Brix) y aceptabilidad del sabor (unidades arbitrarias) de frutos rojo maduro procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. Los datos se presentan como medias  $\pm$ SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

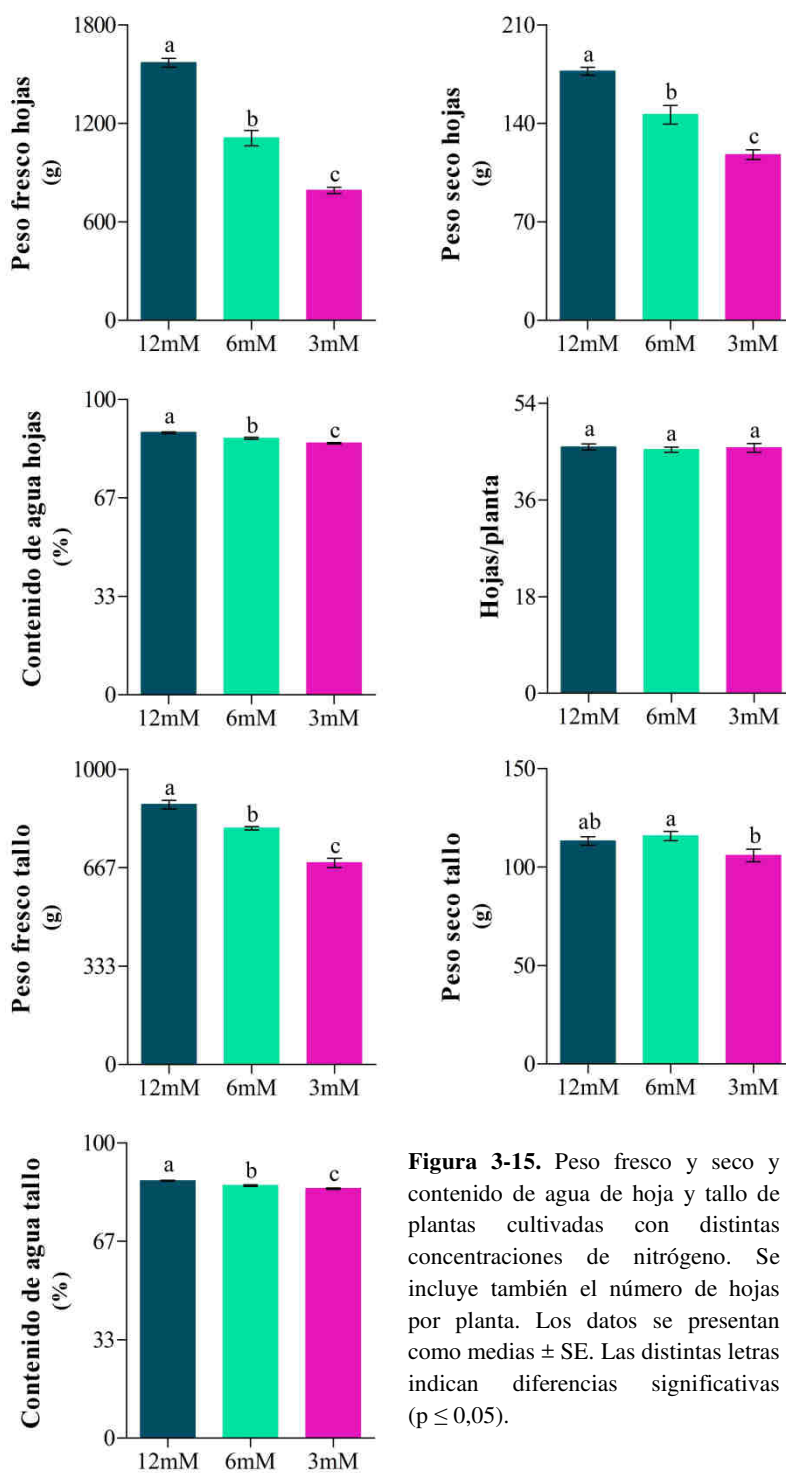
## V. Fase vegetativa

Los distintos tratamientos de nitrógeno tuvieron un efecto significativo en la fase vegetativa de las plantas. La Figura 3-14A muestra las diferencias en el tamaño de hoja en dos estadios del desarrollo para los distintos tratamientos. Como se puede observar en la Figura 3-14B hubo una reducción significativa del área foliar asociada a la disminución del aporte de nitrógeno. Estas diferencias se mantuvieron a lo largo de todo el desarrollo de la hoja. En comparación con el tratamiento de 12 mM N, hubo una disminución de la superficie del 40% en el tratamiento de 6 mM N y del 55% en el de 3 mM N para el estadio H3. En el estadio H8 las diferencias con respecto al tratamiento de 12 mM N fueron menores, ~30% en el caso de 6mM N y 45% en 3mM N.



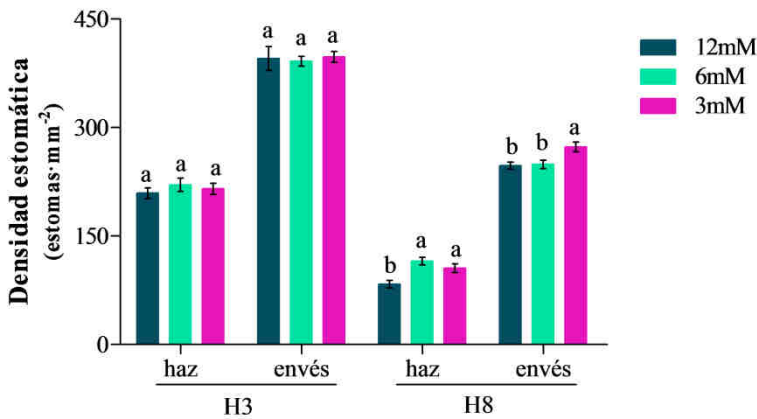
**Figura 3-14.** A, fotografía de hojas correspondientes a los estadios H3 (superior) y H8 (inferior) de plantas cultivadas con tres concentraciones de nitrógeno. B, área foliar medida en los dos estadios de hoja para los distintos tratamientos. H3: tercera hoja contando desde el ápice, H8: octava hoja contando desde el ápice. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada estadio ( $p \leq 0,05$ ).

Los resultados de la estimación de biomasa vegetal en cada tratamiento se muestran en la Figura 3-15. El peso fresco y seco de hojas disminuyó de modo significativo con el contenido de nitrógeno de los tratamientos (Figura 3-15). La mayor reducción del peso fresco de las hojas se observó en las plantas cultivadas con 3mM N, cuyo valor se redujo a la mitad con respecto al tratamiento de 12 mM N, que presentó los valores más altos. En el caso del peso seco, esta reducción en 3mM N con respecto a 12mM N fue de un 33%. El mayor tamaño y peso de hojas observado en el tratamiento de 12 mM N se debió a un mayor contenido de agua, siendo el material de hoja del tratamiento de 3 mM N el que presentó un contenido significativamente menor. En contrapartida, el porcentaje de materia seca fue superior en 3 mM N con respecto a los otros tratamientos. El número de hojas por planta, sin embargo, no varió entre tratamientos (Figura 3-15). Con respecto al tallo, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para los tres parámetros medidos (Figura 3-15). Al igual que en hoja, el peso fresco de los tallos disminuyó con la concentración de N, siendo las plantas cultivadas con 3mM fueron las que presentaron valores significativamente más bajos. En el caso del peso seco, las plantas de 6mM N fueron las que presentaron los valores más altos, seguidos de las de 12mM N, que presentaron valores intermedios, y finalmente los valores más bajos fueron los correspondientes a las plantas regadas con de 3mM N. A pesar de esto, el contenido de agua del tallo disminuyó significativamente al hacerlo la concentración de nitrógeno (Figura 3-15), al igual que ocurrió en hoja.



**Figura 3-15.** Peso fresco y seco y contenido de agua de hoja y tallo de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. Se incluye también el número de hojas por planta. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

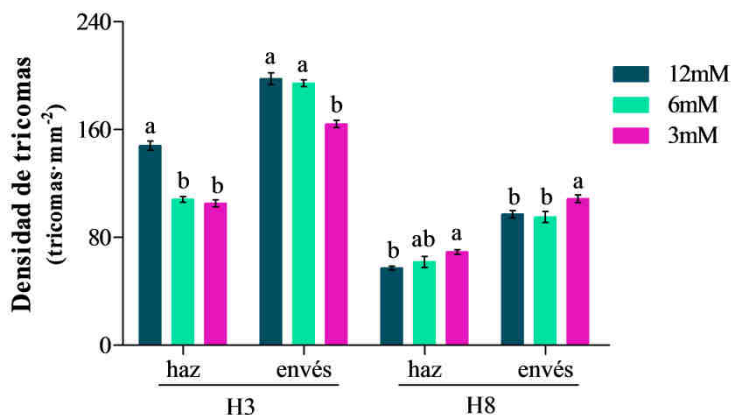
En el capítulo 2 de la presente memoria se muestra cómo la modificación de la ruta de los flavonoides tuvo como consecuencia cambios significativos en la densidad de estomas y tricomas de las hojas. Por ello, se consideró oportuno evaluar si los distintos tratamientos de nitrógeno condujeron a cambios en estos parámetros. La Figura 3-16 muestra el número de estomas por unidad de superficie en el haz y envés de dos estadios de hoja para los distintos tratamientos. Como era esperable, la densidad de estomas fue superior en el envés que en el haz, tanto en la tercera como en la octava hoja. No se observaron diferencias entre tratamientos en la tercera hoja. Sin embargo, en la octava hoja sí hubo diferencias. Las hojas correspondientes al tratamiento con 12 mM N mostraron en el haz un número de estomas significativamente inferior a las de los otros dos tratamientos, aproximadamente un 27% menos. En el envés, sólo en las plantas de 3mM el número de estomas fue significativamente superior.



**Figura 3-16.** Densidad de estomas presentes en el haz y envés de hojas en dos estadios del desarrollo. Hojas procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. H3: tercera hoja contando desde el ápice, H8: octava hoja contando desde el ápice. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada estadio y cara de las hojas ( $p \leq 0,05$ ).

El número de tricomas por unidad de superficie sí varió entre tratamientos en los dos estadios de hoja (Figura 3-17). En la tercera hoja, las plantas cultivadas con 12 mM N presentaron una densidad de tricomas en el haz significativamente superior (~25%) a los otros dos tratamientos. En el envés, sólo el tratamiento de 3 mM N fue significativamente inferior al resto. Por su parte, en la octava hoja la densidad de tricomas fue bastante similar entre los

tratamientos aunque en el tratamiento de 3 mM N el número de tricomas significativamente superior al resto en el haz y envés.

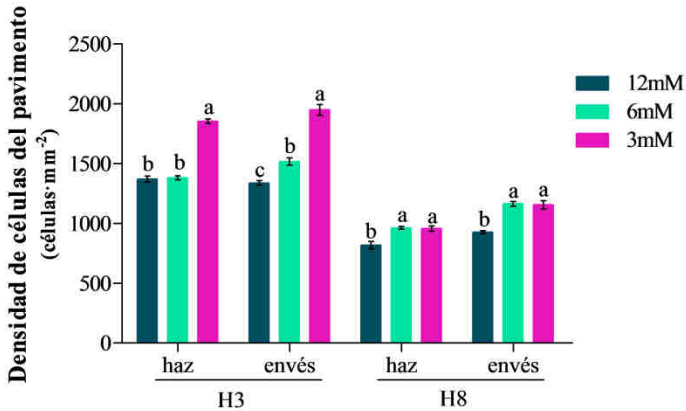


**Figura 3-17.** Densidad de tricomas presentes en el haz y envés de hojas en dos estadios del desarrollo. Hojas procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. H3: tercera hoja contando desde el ápice, H8: octava hoja contando desde el ápice. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada estadio y cara de las hojas ( $p \leq 0,05$ ).

Como ya se hiciese en el capítulo anterior, con la finalidad de conocer si las diferencias o similitudes observadas en la densidad de estomas y tricomas se debían a una alteración de la ratio entre células del pavimento y células especializadas o simplemente respondía a cambios en el tamaño de las células del pavimento, se estimó la densidad de células del pavimento (Figura 3-18). Al igual que para los estomas y tricomas, el número de células del pavimento por unidad de superficie disminuyó a lo largo del desarrollo. En la tercera hoja se observó un aumento significativo en el tratamiento 3mM N, tanto en el haz como en el envés, con respecto a los otros tratamientos. En el caso del envés, 6mM N presentó una densidad intermedia. En la hoja octava las diferencias entre tratamientos fueron menores, no obstante 6 y 3 mM N fueron significativamente superiores tanto en el haz como en el envés.

A partir de estos valores se pudo calcular las ratios células pavimento/estomas y células pavimento/tricomas. Así, el tratamiento de 3 mM N mostró en la tercera hoja una ratio entre las células del pavimento y los estomas significativamente superior a los otros dos tratamientos tanto para el haz ( $6,58 \pm 0,24$  b;  $6,26 \pm 0,15$  b;  $8,61 \pm 0,10$  a. 12, 6 y 3 mM N, respectivamente) como para el envés ( $3,41 \pm 0,19$  b;  $3,87 \pm 0,04$  b;

4,90 ± 0,17 a. 12, 6 y 3 mM N, respectivamente). Este mismo comportamiento se observó en el caso de la ratio células pavimento/tricomas para el haz (9,26 ± 0,24 c; 12,77 ± 0,32 b; 17,64 ± 0,58 a. 12, 6 y 3 mM N, respectivamente) y el envés (6,79 ± 0,38 b; 7,81 ± 0,13 b; 11,89 ± 0,71 a. 12, 6 y 3 mM N, respectivamente). Estas diferencias de distribución se igualaron durante el desarrollo de la hoja.



**Figura 3-18.** Densidad de células del pavimento del haz y envés de hojas en dos estadios del desarrollo. Hojas procedentes de plantas cultivadas con distintas concentraciones de nitrógeno. H3: tercera hoja contando desde el ápice, H8: octava hoja contando desde el ápice. Los datos se presentan como medias ± SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada estadio y cara de las hojas ( $p \leq 0,05$ ).



## DISCUSIÓN

### La disminución del aporte de nitrógeno modificó la cantidad de fenoles acumulados en la cutícula

El estadio de desarrollo de los frutos, influyó de manera significativa en las diferencias de expresión génicas determinadas para distintos genes del metabolismo de los flavonoides en los tres tratamientos de nitrógeno. Estos resultados concuerdan con lo observado por Soubeyrand *et al.* (2014) en uva donde las diferencias de expresión génica entre tratamientos dependieron del estadio del envero. Así, los genes que mostraron diferencias asociadas a la cantidad de nitrógeno aportada lo hicieron hacia el final del envero. Sin embargo, estas diferencias de expresión no fueron muy grandes aunque sí se tradujeron en diferencias significativas en la cantidad de antocianos. En el caso del fruto de tomate se observó un comportamiento contrario esto es, una disminución de la actividad *CHS2*, *PAL4*, *PAL5* y *MYB12* con el aporte de nitrógeno durante la maduración. La expresión de *PAL4* fue muy baja en fruto a pesar de estar descrita como un gen con expresión diferencial en frutos de tomate con la mutación y (Adato *et al.*, 2009). En el caso de *PAL6* se trató de un gen de estadios iniciales del desarrollo del fruto sin apenas expresión en maduración. Como se ha mencionado anteriormente, en la mayoría de los trabajos publicados en los que se ha medido la relación entre la expresión de genes del metabolismo de los flavonoides y la cantidad de nitrógeno, se evaluó los efectos a corto plazo, como ocurre en *A. thaliana*, en la que la expresión de *MYB12*, *PAP2*, *PAL5* y *PAL6* aumentó a los cuatro días del inicio del tratamiento, desapareciendo esta inducción de la expresión al cabo de una semana (Scheible *et al.*, 2004; Lea *et al.*, 2007; Olsen *et al.*, 2009; Løvndal *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, es posible que en fruto de tomate haya una reducción de la actividad CHS y PAL asociada a la disminución de nitrógeno, aunque tampoco se puede descartar la posibilidad de que alguno de los otros genes *CHS*, cuya expresión en epicarpo de fruto fue muy baja (Figura 1-3), o algún otro gen *PAL* no descrito en fruto sufran un cambio en su expresión al disminuir la concentración de nitrógeno. Por ejemplo, el gen *CHS7* mostró una expresión muy baja en epicarpo de fruto verde inmaduro (Figura 1-3) y sin embargo de acuerdo con la información contenida en la base de datos es uno de los genes *CHS* que mostró una expresión notable en epicarpo a 10dda (Figura AV-1). Con respecto a la *PAL*,

hay 15 genes anotados como posibles *PAL* en el genoma de tomate (<https://solgenomics.net>). Finalmente, no se puede descartar la posibilidad de que la reducción de la expresión de estos genes con la cantidad de nitrógeno durante la maduración se deba a que se haya desencadenado un silenciamiento de los mismos (Baulcombe, 2004). Sin embargo, si bien la *CHS2* presenta un nivel alto de expresión basal (Figura AV-1), no parece ser el caso para el resto de los genes que muestran el mismo perfil de expresión en maduración.

A pesar de que las diferencias de expresión podrían apuntar a una disminución de la cantidad de flavonoides al reducir el aporte de nitrógeno, los resultados obtenidos en cutícula mostraron lo contrario. Se observó un aumento de fenoles en la cutícula con la reducción de nitrógeno. Este aumento sólo se detectó durante la maduración, en los estadios pintón y rojo maduro, tanto en la cantidad de fenoles por unidad de superficie como en el porcentaje de los mismos, fue bastante significativo si se tiene en cuenta que se trata de un componente minoritario de la cutícula. Sin embargo, estas diferencias en compuestos fenólicos contrastan con lo observado en la bibliografía a nivel de fruto (Stewart *et al.*, 2001; Bénard *et al.*, 2009). No obstante, es necesario indicar que Stewart *et al.* (2001) sólo estudiaron la concentración de flavonoles en la piel del fruto, pero no de naringenina o chalconaringenina, uno de los principales flavonoides que se acumulan en frutos maduros (Slimestad y Verheul, 2009) y aparentemente el único que se incorpora a la cutícula, tal y como se ha determinado en el capítulo 2 de esta memoria, donde se vio que los flavonoles no se incorporan a la misma. Bénard *et al.* (2009) midieron la cantidad de naringenina sin detectar diferencias entre tratamientos de nitrógeno. Aunque sería necesario indicar que, al contrario que Stewart *et al.* (2001), las medidas no se realizaron en la piel sino en el fruto completo, por lo que sería posible que las diferencias no se observaran por un efecto de dilución ya que, como se mencionó en la *Introducción general*, la mayoría de los flavonoides se acumulan en la piel (Meléndez-Martínez *et al.*, 2010). Por otro lado, tal y como los autores mencionan, la cantidad de naringenina detectada fue inferior a lo descrito en la bibliografía para fruto entero de tomate (Bénard *et al.*, 2001; Slimestad y Verheul, 2005a; Raffo *et al.*, 2006). Además, los valores de cantidad de flavonoides no variaron a lo largo del ciclo, de tal modo que fueron similares en febrero y julio (Bénard *et al.*, 2009). Esto es inusual ya que la síntesis de flavonoides está activada por la luz y la temperatura (Olsen *et al.*, 2009;

Zoratti *et al.*, 2014) y está descrito un aumento en la cantidad de flavonoides del fruto de tomate entre invierno y primavera-verano (Slimestad y Verheul, 2005b). De igual manera, a nivel de cutícula está descrito un aumento de la cantidad de flavonoides del doble entre plantas de tomate cultivadas en invierno y primavera en condiciones controladas y comparables de temperatura y humedad relativa (Domínguez *et al.*, 2012).

Por otro lado, la técnica espectrofotométrica empleada para medir los fenoles totales no permite distinguir entre flavonoides y derivados cinámicos, por lo que es posible que este aumento observado en la cutícula no se deba exclusivamente a flavonoides sino a también a derivados cinámicos como los ácidos *p*-cumárico y *p*-hidroxi-benzoico que también se acumulan en la cutícula (España *et al.*, 2014a). En este sentido, Bénard *et al.* (2009) observaron diferencias en la cantidad de algunos derivados cinámicos asociadas a los distintos tratamientos de nitrógeno.

En ausencia de un aumento en la expresión de los genes conocidos involucrados en la síntesis de fenoles y flavonoides, el aumento en la cantidad de fenoles de la cutícula en respuesta a la reducción del aporte de nitrógeno podría explicarse por un aumento del transporte de estos compuestos a la cutícula. Se desconoce en gran medida cómo ocurre el transporte de flavonoides al exterior celular, aunque se han postulado varias familias de transportadores como posibles candidatas (Zhao, 2015). Por otro lado, este efecto podría ser simplemente consecuencia de un aumento en la cantidad de fenilalanina disponible. Margna (1977) apuntó la posibilidad de una regulación de la ruta de los fenilpropanoides controlada por la disponibilidad de sustrato. Se basó en la escasa correlación observada en la bibliografía entre los niveles de actividad PAL y la cantidad de derivados cinámicos acumulada, así como en la capacidad de la fenilalanina suministrada exógenamente de promover la acumulación de fenilpropanoides. Scheible *et al.* (2004) describieron una disminución de la cantidad de fenilalanina y en general de la ruta del shikimato tras la adición de  $\text{NO}_3^-$  a plántulas de *A. thaliana* crecidas con baja concentración de nitrógeno. Por otro lado, en cultivos celulares de fresa y *Silybum marianum* (L.) Gaertn. se ha observado un aumento de la cantidad de antocianos y naringenina, respectivamente, tras el aporte exógeno de fenilalanina (Edahiro *et al.*, 2005; Rahimi *et al.*, 2011). En este sentido, el incremento en la expresión de los genes *PAL4* y *PAL5* observado al reducir la cantidad de

nitrógeno en verde maduro, el estadio anterior al inicio de la maduración, podría tener como efecto el aumento de la cantidad de sustrato en forma de ácido cinámico para estadios posteriores.

La disminución en la cantidad de cutícula observada entre los estadios pintón y rojo maduro para los tratamientos de 12 y 3 mM N se debió principalmente a una pérdida de cutina y polisacáridos. En el tratamiento de 6 mM N la pérdida de polisacáridos se vio compensada con un pequeño aumento de cutina. Se ha descrito una pérdida de la cantidad de polisacáridos de la cutícula durante este periodo, posiblemente relacionada con la maduración y degradación de las paredes celulares, que en algunos genotipos puede ir acompañada de una pérdida de cutina (Domínguez *et al.*, 2008). En este sentido se podría pensar que la degradación de las paredes celulares favoreció una mayor pérdida de cutina en los tratamientos extremos de 12 y 3 mM N. Puesto que las diferencias en grosor son muy pequeñas entre los tratamientos, esta pérdida de material posiblemente llevaría asociada una disminución de la densidad de la cutícula. Un comportamiento similar se observó en las cutículas procedentes de tomates que silencian de manera transitoria la *CHS* (España *et al.*, 2014b). Hubo una disminución significativa de la cantidad de cutícula sin afectar al grosor, lo que condujo a una reducción de la densidad. Relativo a la expresión de *CHS*, la disminución de cantidad de cutícula durante la maduración en los tratamientos de 12 y 3 mM N siguió el mismo patrón que la expresión de *CHS1* durante el estadio pintón. Si bien los resultados obtenidos en esta memoria no permiten establecer ninguna relación entre ambas.

### Relación entre la nutrición nitrogenada y el tamaño celular

La disminución del aporte de nitrógeno llevó asociada una reducción clara del tamaño de las células de la epidermis del fruto durante la maduración. Esta reducción no afectó al tamaño final del fruto, que no varió entre tratamientos, pero sí al número de células por unidad de superficie, el cual aumentó compensando así su menor tamaño. Estos cambios no se vieron acompañados de diferencias visuales en el tamaño de las células del parénquima, por lo que parece que afectaron sólo a las del epicarpo. Un comportamiento parecido se observó a nivel de hoja donde la densidad de células del pavimento fue superior en las plantas procedentes de los tratamientos con menor concentración de nitrógeno. Con todo, el

comportamiento en hoja difirió del de fruto en dos aspectos. Por un lado, las diferencias se manifestaron desde estadios iniciales y se mantuvieron a lo largo del desarrollo de la hoja y, por otro, la reducción de nitrógeno conllevó una disminución significativa del tamaño de las hojas y de la biomasa total, tal y como está descrito en la bibliografía (Pill *et al.*, 1978; Huett, 1986; Guidi *et al.*, 1997; Dumas *et al.*, 1993; Scholberg *et al.*, 2000; Le Bot *et al.*, 2001; Kavanová *et al.*, 2008; Bénard *et al.*, 2009; Frías-Moreno *et al.*, 2014). En *Lolium perenne* L. se ha descrito que la disminución del área foliar asociada a la reducción del nitrógeno se debe a una alteración de las tasas de división y expansión celulares (Kavanová *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos de densidad de células del pavimento en la presente memoria no permiten dilucidar si hubo cambios en la tasa de división celular ya que, al verse modificado el tamaño foliar, sería necesario haber estudiado estadios del desarrollo anteriores a la tercera hoja. No obstante, sí pudieron confirmarse cambios en la expansión al tener las células del pavimento menor tamaño. Esta disminución del tamaño celular en la epidermis de hoja se relacionó positivamente con el porcentaje de agua acumulado, ya que hubo un mayor porcentaje de materia seca en las plantas cultivadas con menos nitrógeno. Los datos aportados por la bibliografía difieren en este aspecto ya que algunos autores observaron un aumento del porcentaje de materia seca con la reducción del nitrógeno (Kobryń *et al.*, 2005) pero otros no vieron diferencias (Kaniszewski *et al.*, 1987). Dado el papel del agua como inductor de la presión de turgor que dirige la expansión celular, un menor contenido en agua implicaría una disminución en el estrés mecánico ejercido sobre las paredes celulares (Cosgrove, 2016) y por ende una menor tasa de expansión.

Son varios los genes que se han identificado en tomate como responsables de la alteración de los patrones de división y expansión celulares en fruto, pero en la amplia mayoría de ellos también se vio afectado el tamaño final del órgano (Frery *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 2007; Mathieu-Rivet *et al.*, 2010; Czerednik *et al.*, 2012; Chakrabarti *et al.*, 2013). Como ya se mencionó en el capítulo anterior, son varios los trabajos que han establecido una asociación entre los flavonoides y el tamaño celular y de órganos, postulando la posibilidad de que participen en la regulación del tamaño celular mediado por auxinas (Ringli *et al.*, 2008; Laffont *et al.*, 2010). En el caso del tomate, España *et al.* (2014b) observaron un menor tamaño de las células del epicarpo tras el silenciamiento transitorio durante la maduración de la *CHS*. Si bien la disminución del tamaño se pudo asociar a una reducción drástica

de la síntesis de flavonoides, los resultados obtenidos en el presente capítulo mostraron un comportamiento contrario. La reducción del tamaño celular fue paralela a la disminución de la concentración de nitrógeno y al aumento de los flavonoides en la cutícula. Si bien no se puede asociar una mayor cantidad de flavonoides en la cutícula con más expresión de los genes *CHS* (ver Figura 3-2 y Tabla 3-2; España *et al.*, 2014b) o necesariamente con una mayor concentración de flavonoides a nivel celular, es poco probable que esta disminución del tamaño celular esté mediada por los flavonoides.

El nitrato no es sólo un nutriente necesario para el desarrollo de las plantas sino que además actúa como señal induciendo o reprimiendo distintos genes (Krapp *et al.*, 2014; Medici y Krouk, 2014) así como regulando hormonas tales como las auxinas, citoquininas y etileno (Kiba *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2015). En este sentido, se ha descrito una regulación de los niveles de auxina mediado por el nitrógeno (Tian *et al.*, 2008). Así, una disminución del aporte de nitrógeno condujo a un aumento del contenido de auxinas en *A. thaliana* (Tian *et al.*, 2008). Adicionalmente se ha observado que la proteína TOR juega un papel central en la interconexión entre señales nutricionales y diversos procesos metabólicos para ajustar el crecimiento y desarrollo de las plantas (Bögre *et al.*, 2013; Henriques *et al.*, 2014). En *A. thaliana* la limitación de nutrientes produjo una reducción de crecimiento similar al observado tras la inhibición de TOR (Ren *et al.*, 2012) por lo que se postula que TOR participaría en el control de la división y expansión celular (Xiong y Sheen, 2015). Por tanto, es posible que la reducción del aporte de nitrógeno desencadene una cascada de señales, quizá mediada por la proteína TOR, que conduzca a una reducción del tamaño celular y de los órganos, que podría estar mediado por auxina.

### **La disminución en el suministro de nitrógeno no afectó al crecimiento ni a la calidad del fruto**

La disminución del aporte de nitrógeno durante todo el ciclo de la planta no afectó a la cosecha, el número de frutos, su tamaño o peso medio. En la bibliografía son varios los trabajos que han descrito una disminución de la cosecha con la reducción del nitrógeno (Huett, 1986; Kaniszewski *et al.*, 1987; Warner *et al.*, 2004; Frías-Moreno *et al.*, 2014). En estos trabajos se estimó la cosecha total, incluyendo los frutos verdes, pero cuando se determinó la cosecha de frutos maduros no se apreciaron diferencias o éstas

fueron muy bajas (Kaniszewski *et al.*, 1987; Le Bot *et al.*, 2001; Warner *et al.*, 2004; Parisi *et al.*, 2006; Bénard *et al.*, 2009). Igualmente, Warner *et al.* (2004) y Bénard *et al.* (2009) no observaron diferencias en el peso medio de los frutos maduros. Huett (1986) describió un retraso en el cuajado de los frutos al reducir la cantidad de nitrógeno, el cual no se observó en el presente estudio, aunque sí un adelanto en la maduración de los tomates con la reducción de nitrógeno.

El color y la dureza de los frutos son dos de los caracteres más importantes que definen la calidad externa de los frutos, el primer aspecto que los consumidores evalúan (Simonne *et al.*, 2007). La dureza de los frutos también fue similar en los distintos tratamientos de nitrógeno de acuerdo con lo descrito por Kaniszewski *et al.* (1987), Warner *et al.* (2004) y Bénard *et al.* (2009). Otros autores sí han observado una disminución de la dureza con la reducción de nitrógeno (Kobryn y Hallmann, 2005; Wang *et al.*, 2007; Frías-Moreno *et al.*, 2014), lo que sugiere una influencia de la variedad de estudio e incluso de las condiciones ambientales, ya que en algunos casos el comportamiento varió entre recolecciones. Las diferencias en el color de los frutos, aunque estadísticamente significativas, fueron muy pequeñas y no modificarían la elección de los consumidores. Esto está de acuerdo con los resultados de la bibliografía, donde no se observan diferencias en el color asociadas al nitrógeno (Kaniszewski *et al.*, 1987; Simonne *et al.*, 2007; Bénard *et al.*, 2009). Finalmente, el contenido en sólidos solubles y la acidez tampoco se vieron afectados de modo significativo por el nitrógeno. Como ya se mencionó en la *Introducción*, los resultados referidos en la bibliografía muestran diferentes comportamientos incluso entre las fechas de recolección, desde ausencia de efecto a aumento o disminución de estos parámetros con el nitrógeno (Warner *et al.*, 2004; Simmone *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Bénard *et al.*, 2009; Frías-Moreno *et al.*, 2014). Todo esto apunta, de nuevo, a que la variedad objeto de estudio y las condiciones de cultivo y ambientales serían más determinantes que la cantidad de nitrógeno del cultivo a la hora de determinar la calidad interna de los frutos.

El agrietado es una fisiopatía importante en el cultivo del tomate, la cual se vio reducida al disminuir el aporte de nitrógeno a las plantas. La mayoría de los trabajos que han relacionado el contenido de nitrógeno con la calidad del fruto de tomate se han centrado en parámetros como los anteriormente citados, pero no en la incidencia de fisiopatías. Sólo Warner *et al.* (2004)

estudiaron la incidencia del BER (*blossom-end rot*) observando una reducción con el menor aporte de nitrógeno. Está descrito que la cantidad de cutícula y de fenoles son parámetros que influyen en el agrietado, ya que modifican las propiedades mecánicas de la cutícula (Domínguez *et al.*, 2009; Domínguez *et al.*, 2012; España, 2012). En este sentido la cantidad de cutícula y de fenoles fueron significativamente superiores en los tratamientos de 6 y 3 mM N, mostrando ambos parámetros una relación negativa con la tasa de agrietado. Igualmente, el grado de invaginación fue superior en los tratamientos de 6 y 3 mM N. Por otro lado, Peet y Willis (1995) observaron que un aumento del riego favoreció el agrietado del fruto de tomate y conllevó un aumento del peso de los frutos. El tamaño final de un órgano está determinado por la expansión celular la cual está dirigida por el aumento en la presión de turgor (Wolf *et al.*, 2012). Así, Domínguez *et al.* (2012) observaron que los frutos con una mayor tasa de crecimiento durante la maduración fueron más proclives a agrietar. Tal y como se destacó en el apartado anterior, los frutos crecidos con 6 y 3 mM N mostraron una epidermis con un menor tamaño celular y por ende mayor número de células epidérmicas. Por lo que es posible que esta reducción en la expansión celular también contribuya a la disminución del agrietado, bien por una menor toma de agua o bien haciendo la epidermis más robusta. Finalmente, la menor pérdida de agua de los frutos de 12 mM N durante la poscosecha podría estar asociada al menor contenido en fenoles de su cutícula pero no al mayor aumento de ceras que suele acompañar a la ausencia de fenoles en la cutícula de frutos rosa (España *et al.*, 2014b; Heredia *et al.*, 2015). Por otra parte, como ya se indicó en el capítulo anterior, ésta podría deberse a cambios metabólicos del fruto asociados al aporte de nitrógeno.





# CONCLUSIONES

*"Ciencia es todo aquello sobre lo cual  
siempre cabe discusión"*  
*José Ortega y Gasset*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

- Se han identificado y estudiado los patrones de expresión génica de los miembros de las familias *CHS*, *CHI* y *F3H* que presentan mayor similitud a las secuencias canónicas de estas proteínas. Adicionalmente, se han identificado los miembros de dichas familias que tienen una función asociada al metabolismo de poliquétidos, ácidos grasos y alcaloides respectivamente, estudiando además su expresión en distintos tejidos a lo largo del desarrollo.
- La acumulación de chalconaringenina en el fruto de tomate durante la maduración está asociada a un aumento de la expresión de *CHS* y a una reducción de la expresión de los genes con función *CHI* conocida.
- La sobreexpresión de los genes *PhCHI* y *GhFNS* condujo a cambios en la morfología y composición química de la cutícula del fruto de tomate, modificando las propiedades mecánicas de la misma y afectando al agrietado. Adicionalmente, el peso medio de los frutos y su acidez valorable también se vieron alterados.
- El aumento en la cantidad de cutícula observado en los frutos de las plantas que sobreexpresan *GhFNS* no está directamente relacionado con cambios en la expresión de ninguno de los genes conocidos relacionados con la cutícula, con la excepción del factor de transcripción *MYB41*, asociado a respuesta a estrés.
- La modificación de la ruta de síntesis de flavonoides ha permitido establecer claramente que la chalconaringenina es el único flavonoide que se acumula en la cutícula del fruto de tomate durante la maduración.
- El cultivo de plantas de tomate con un menor aporte de nitrógeno conllevó un aumento de la cantidad de flavonoides presentes en la cutícula y una disminución de la tasa de agrietado sin afectar a otros parámetros, como la producción o la calidad interna de los frutos. Esta reducción del nitrógeno suministrado a lo largo del cultivo contribuiría a disminuir los problemas medioambientales asociados.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# BIBLIOGRAFÍA

*"La ciencia es un cementerio de ideas  
muertas, aunque de ellas puede salir la  
vida"*

*Miguel de Unamuno*





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

- Abe, I., Morita, H.** 2010. Structure and function of the chalcone synthase superfamily of plant type III polyketide synthases. *Natural Product Reports*, **27**, 809-838.
- Abe, I., Oguro, S., Utsumi, Y., Sano, Y., Noguchi, H.** 2005a. Engineered biosynthesis of plant polyketides: chain length control in an octaketide-producing plant type III polyketide synthase. *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 12709-16.
- Abe, I., Utsumi, Y., Oguro, S., Morita, H., Sano, Y., Noguchi, H.** 2005b. A plant type III polyketide synthase that produces pentaketide chromone. *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 1362-1363.
- Adato, A., Mandel, T., Mintz-Oron, S., Venger, I., Levy, D., Yativ, M., Domínguez, E., Wang, Z., de Vos, R.C., Jetter, R., Schreiber, L., Heredia, A., Rogachev, I., Aharoni, A.** 2009. Fruit-surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a *SIMYB12*-regulated transcriptional network. *PLoS Genetics*, **5**, e1000777.
- Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., Tattini, M.** 2013. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry*, **72**, 35-45.
- Aharoni, A., Dixit, S., Jetter, R., Thoenes, E., van Arkel, G., Pereira, A.** 2004. The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **16**, 2463-2480.
- Almeida, D.P.F., Huber, D.J.** 2001. Transient increase in locular pressure and occlusion of endocarpic apertures in ripening tomato fruit. *Journal of Plant Physiology*, **158**, 199-203.
- Aloni, B., Karni, L., Moreshet, S., Yao, C., Stanghellini, C.** 1999. Cuticular cracking in bell pepper fruit: II. Effects of fruit water relations and fruit expansion. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **74**, 1-5.
- Aloni, B., Karni, L., Rylski, I., Cohen, Y., Lee, Y., Fuchs, M., Moreshet, S., Yao, C.** 1998. Cuticular cracking in pepper fruit. I. Effects of night temperature and humidity. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **73**, 743-749.
- Álvarez-Herrera, J., Balaguera-López, H., Fischer, G.** 2010. Effect of irrigation and nutrition with calcium on fruit cracking of the cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) in the three strata of the plant. *Acta Horticulturae*, **928**, 163-170.
- Andersen, P., Richardson, D.** 1982. A rapid method to estimate fruit water status with special reference to rain cracking of sweet cherries. *Journal of American Society for Horticultural Science*, **107**, 441-444.
- Austin, M.B., Noel, J.P.** 2003. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports*, **20**, 79-110.

- Azuma, A., Kobayashi, S., Mitani, N., Shiraishi, M., Yamada, M., Ueno, T., Kono, A., Yakushiji, H., Koshita, Y. 2008. Genomic and genetic analysis of *Myb*-related genes that regulate anthocyanin biosynthesis in grape berry skin. *Theoretical and Applied Genetics*, **117**, 1009-1019.
- Azuma, A., Yakushiji, H., Koshita, Y., Kobayashi, S. 2012. Flavonoid biosynthesis-related genes in grape skin are differentially regulated by temperature and light conditions. *Planta*, **236**, 1067-1080.
- Bach, L., Michaelson, L.V., Haslam, R., Bellec, Y., Gissot, L., Marion, J., Da Costa, M., Boutin, J.P., Miquel, M., Tellier, F., Domergue, F., Markham, J.E., Beaudoin, F., Napier, J.A., Faure, J.D. 2008. The very-long-chain hydroxy fatty acyl-CoA dehydratase *PASTICCINO2* is essential and limiting for plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 14727-14731.
- Baker E.A., Bukovac, M.J., Hunt, G.M. 1982. Composition of tomato fruit cuticle as related to fruit growth and development. En: Cutler, D.F., Alvin, K.L., Price, C.E. (eds). *The Plant Cuticle*. Academic Press, Londres, 33-44.
- Ballester, A.R., Molthoff, J., de Vos, R., te Lintel Hekkert, B., Orzáez, D., Fernández-Moreno, J.P., Tripodi, P., Grandillo, S., Martin, C., Heldens, J., Ykema, M., Granell, A., Bovy, A. 2010. Biochemical and molecular analysis of pink tomatoes: deregulated expression of the gene encoding transcription factor *SIMYB12* leads to pink tomato fruit color. *Plant Physiology*, **152**, 71-84.
- Bally, I.S. 1999. Changes in the cuticular surface during the development of mango (*Mangifera indica* L.) cv. Kensington Pride. *Scientia Horticulturae*, **79**, 13-22.
- Ban, Y., Honda, C., Hatsuyama, Y., Igarashi, M., Bessho, H., Moriguchi, T. 2007. Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. *Plant Cell and Physiology*, **48**, 958-970.
- Banasiak, J., Biala, W., Staszko, A., Swarczewicz, B., Kepczynska, E., Figlerowicz, M., Jasinski, M. 2013. A *Medicago truncatula* ABC transporter belonging to subfamily G modulates the level of isoflavonoids. *Journal of Experimental Botany*, **64**, 1005-1015.
- Bar-Yosef, B., Sagiv, B. 1982. Response of tomatoes to N and water applied via a trickle irrigation system. I. Nitrogen. *Agronomy Journal*, **74**, 633-637.
- Bargel, H., Neinhuis, C. 2004. Altered tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit cuticle biomechanics of a pleiotropic *non ripening* mutant. *Journal of Plant Growth Regulation*, **23**, 61-75.
- Bargel, H., Koch, K., Cerman, Z., Neinhuis, C. 2006. Structure-function relationships of the plant cuticle and cuticular waxes - a smart material? *Functional Plant Biology*, **33**, 893-910.



- Bassolino, L., Zhang, Y., Schoonbeek, H. J., Kiferle, C., Perata, P., Martin, C.** 2013. Accumulation of anthocyanins in tomato skin extends shelf life. *New Phytologist*, **200**, 650-655.
- Bauchet, G., Causse, M.** 2012. Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. En: Çalişkan M. (ed). *Genetic Diversity in Plants*. InTech, DOI 10.5772/33073, 133-162.
- Baulcombe, D.** 2004. RNA silencing in plants. *Nature*, **431**, 356-363.
- Beaudoin, F., Wu, X.Z., Li, F.L., Haslam, R.P., Markham, J.E., Zheng, H.Q., Napier, J.A., Kunst, L.** 2009. Functional characterization of the *Arabidopsis* beta-ketoacyl-coenzyme A reductase candidates of the fatty acid elongase. *Plant Physiology*, **150**, 1174-1191.
- Bednar, R.A., Hadcock, J.R.** 1988. Purification and characterization of chalcone isomerase from soybeans. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**, 9582-9588.
- Bemer, M., Karlova, R., Ballester, A.R., Tikunov, Y.M., Bovy, A.G., Wolters-Arts, M., Rossetto, P.B., Angenent, G.C., de Maagd, R.A.** 2012. The tomato *FRUITFULL* homologs *TDR4/FUL1* and *MBP7/FUL2* regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening. *The Plant Cell*, **24**, 4437-4451.
- Bénard, C., Gautier, H., Bourgaud, F., Grasselly, D., Navez, B., Caris-Veyrat, C., Weiss, M., Génard, M.** 2009. Effects of low nitrogen supply on tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit yield and quality with special emphasis on sugars, acids, ascorbate, carotenoids, and phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 4112-4123.
- Bergougnoux, V.** 2014. The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, **32**, 170-189.
- Besseau, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B., Legrand, M.** 2007. Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *The Plant Cell*, **19**, 148-162.
- Bessire, M., Borel, S., Fabre, G., Carraça, L., Efremova, N., Yephremov, A., Cao, Y., Jetter, R., Jacquat, A.C., Métraux, J.P., Nawrath, C.** 2011. A member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE family of ATP binding cassette transporters is required for the formation of a functional cuticle in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **23**, 1958-1970.
- Bessire, M., Céline Chassot, C., Jacquat, A.C., Humphry, M., Borel, S., MacDonald-Comber Petétot, J., Métraux, J.P., Nawrath, C.** 2007. A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *The Embo Journal*, **26**, 2158-2168.

- Bidart-Bouzat, M.G., Kliebenstein, D.J.** 2008. Differential levels of insect herbivory in the field associated with genotypic variation in glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Chemical Ecology*, **34**, 1026–1037.
- Bird, D., Beisson, F., Brigham, A., Shin, J., Greer, S., Jetter, R., Kunst, L., Yephremov, A., Samuels, L.** 2007. Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *The Plant Journal*, **52**, 485-498.
- Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Díez, M.J., Nuez, F.** 2012. Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS ONE*, **7**, e48198.
- Bögre, L., Henriques, R., Magyar, Z.** 2013. TOR tour to auxin. *The EMBO Journal*, **32**, 1069-1071.
- Bögre, L., Magyar, Z., López-Juez, E.** 2008. New clues to organ size control in plants. *Genome Biology*, **9**, 226.
- Bongue-Bartelsman, M., Phillips, D.** 1995. Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, **33**, 539-546.
- Boraston, A.B.** 2005. The interaction of carbohydrate-binding modules with insoluble non-crystalline cellulose is enthalpically driven. *Biochemical Journal*, **385**, 479-484.
- Borisjuk, N., Hrmova, M., Lopato, S.** 2014. Transcriptional regulation of cuticle biosynthesis. *Biotechnology Advances*, **32**, 526-540.
- Bovy, A., de Vos, R., Kemper, M., Schijlen, E., Pertejo, M.A., Muir, S., Collins, G., Robinson, S., Verhoeven, M., Hughes, S., Santos-Buelga, C., van Tunen, A.** 2002. High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes LC and C1. *The Plant Cell*, **14**, 2509-2526.
- Bovy, A., Schijlen, E., Hall, R.D.** 2007. Metabolic engineering of flavonoids in tomato (*Solanum lycopersicum*): the potential for metabolomics. *Metabolomics*, **3**, 399-412.
- Britsch, L., Grisebach, H.** 1986. Purification and characterization of (2S)-flavanone 3-hydroxylase from *Petunia hybrida*. *European Journal of Biochemistry*, **156**, 569-577.
- Britsch, L., Dedio, J., Saedler, H., Forkmann, G.** 1993. Molecular characterization of flavanone 3 $\beta$ -hydroxylases. Consensus sequence, comparison with related enzymes and the role of conserved histidine residues. *European Journal of Biochemistry*, **217**, 745-754.
- Britsch, L., Heller, W., Grisebach, H.** 1981. Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **36**, 742-750.

- Brödenfeldt, R., Mohr, H.** 1988. Time courses for phytochrome-induced enzyme levels in phenylpropanoid metabolism (phenylalanine ammonia-lyase, naringenin-chalcone synthase) compared with time courses for phytochrome-mediated end-product accumulation (anthocyanin, quercetin). *Planta*, **176**, 383-390.
- Bögre, L., Henriques, R., Magyar, Z.** 2013. TOR tour to auxin. *The EMBO Journal*, **32**,1069-1071.
- Broun, P., Poindexter, P., Osborne, E., Jiang, C.Z., Riechmann, J.L.** 2004. *WIN1*, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 4706-4711.
- Brown, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A.S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, L., Muday, G.K.** 2001. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **126**, 524-535.
- Brown, G., Wilson, S., Boucher, W., Graham, B., McGlasson, B.** 1995. Effects of copper-calcium sprays on fruit cracking in sweet cherry (*Prunus avium*). *Scientia Horticulturae*, **62**, 75-80.
- Bruck, D.K., Walker, D.B.** 1985. Cell determination during embryogenesis in *Citrus jambhiri*. I. Ontogeny of the epidermis. *Botanical Gazette*, **146**, 188-195.
- Buer, C.S., Djordjevic, M.A.** 2009. Architectural phenotypes in the transparent testa mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 751-763.
- Buer, C.S., Imin, N., Djordjevic, M.A.** 2010. Flavonoids: new roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*, **52**, 98-111.
- Buer, C.S., Kordbacheh, F., Truong, T.T., Hocart, C.H., Djordjevic, M.A.** 2013. Alteration of flavonoid accumulation patterns in transparent testa mutants disturbs auxin transport, gravity responses, and imparts long-term effects on root and shoot architecture. *Planta*, **238**, 171-189.
- Buer, C.S., Muday, G.K.** 2004. The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. *The Plant Cell*, **16**, 1191-1205.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T.** 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, **55**, 611-622.
- Burbulis, I.E., Winkel-Shirley, B.** 1999. Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 12929-12934.
- Burdick, A.** 1958. New mutants. *Tomato Genetics Cooperative Report*, **8**, 9-11.

- Butelli, E., Titta, L., Giorgio, M., Mock, H.P., Matros, A., Peterek, S., Schijlen, E., Hall, R.D., Bovy, A., Luo, J., Martin, C.** 2008. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnology*, **26**, 1301-1308.
- Caldicott, A.B., Eglinton, G.** 1976. Cutin acids from bryophytes: an  $\omega$ -1 hydroxy alkanolic acid in two liverwort species. *Phytochemistry*, **15**, 1139-1143.
- Caldicott, A.B., Simoneit, B.R.T., Eglinton, G.** 1975. Alkanetriols in psilotophyte cutins. *Phytochemistry*, **14**, 2223-2228.
- Casado, C.G., Heredia, A.** 1999. Structure and dynamics of reconstituted cuticular waxes of grape berry cuticle (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Experimental Botany*, **50**, 175-182.
- Casado, C.G., Heredia, A.** 2001. Specific heat determination of plant barrier lipophilic components: biological implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1511**, 291-296.
- Chakrabarti, M., Zhang, N., Sauvage, C., Muños, S., Blanca, J., Cañizares, J., Diez, M.J., Schneider, R., Mazourek, M., McClead, J., Causse, M., van der Knaap, E.** 2013. A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 17125-17130.
- Chamel, A., Pineri, M., Escoubes, M.** 1991. Quantitative determination of water sorption by plant cuticles. *Plant, Cell & Environment*, **14**, 87-95.
- Chan, T., Galati, G., O'Brien, P.J.** 1999. Oxygen activation during peroxidase catalyzed metabolism of flavones and flavanones. *Chemico-Biological Interactions*, **122**, 15-25.
- Chang, A., Lim, M.H., Lee, S.W., Robb, E.J., Nazar, R.N.** 2008. Tomato phenylalanine ammonia-lyase gene family, highly redundant but strongly underutilized. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 33591-33601.
- Chen, X., Goodwin, S.M., Boroff, V.L., Liu, X., Jenks, M.A.** 2003. Cloning and characterization of the WAX2 gene of Arabidopsis involved in cuticle membrane and wax production. *The Plant Cell*, **15**, 1170-1185.
- CIE. Commision Internationale de l'Eclairage.** 1978. Recommendations on Uniform Color Spaces-Color-Difference Equations: Psychometric Color Terms. Suplemento 2 a la publicación 15 de la CIE (1971). Buró Central de la CIE, Viena.
- Clegg, M.T., Durbin, M.L.** 2000. Flower color variation: a model for the experimental study of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 7016-7023.
- Clifton, L.J., McDonough, M.A., Ehrismann, D., Kershaw, N.J., Granatino, N., Schofield, C.J.** 2006. Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded  $\beta$ -helix fold proteins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **100**, 644-69.

- Cockshull, K.E., Graves, C.J., Cave, C.R. 1992. The influence of shading on yield of glasshouse tomatoes. *Journal of Horticultural Science*, **67**, 11-24.
- Coe, E.H., McCormick, S.M., Modena, S.A. 1981. White pollen in maize. *Journal of Heredity*, **72**, 318-320.
- Cominelli, E., Sala, T., Calvi, D., Gusmaroli, G., Tonelli, C. 2008. Over-expression of the Arabidopsis *AtMYB41* gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *The Plant Journal*, **53**, 53-64.
- Conn, S., Curtin, S., Bézier, A., Franco, C., Zhang, W. 2008. Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 3621-3634.
- Considine, J.A., Knox, R.B. 1979. Development and histochemistry of the cells, cell walls, and cuticle of the dermal system of fruit of the grape, *Vitis vinifera* L. *Protoplasma*, **99**, 347-365.
- Considine, J., Brown, K. 1981. Physical aspects of fruit growth: theoretical analysis of distribution of surface growth forces in fruit in relation to cracking and splitting. *Plant Physiology*, **68**, 371-376.
- Considine, J.A., Kriedemann, P.E. 1972. Fruit splitting in grapes: determination of the critical turgor pressure. *Australian Journal of Agricultural Research*, **23**, 17-24.
- Cook, M.E., Graham, L.E. 1998. Structural similarities between surface layers of selected Charophycean algae and Bryophytes and the cuticles of vascular plants. *International Journal of Plant Sciences*, **159**, 780-787.
- Corey, K.A., Tan, Z.Y. 1990. Induction of changes in internal gas pressure of bulky plant organs by temperature gradients. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **115**, 308-312.
- Corner, E.J.H. 1964. *The life of plants*. University of Chicago Press, Chicago.
- Cosgrove, D.J. 2016. Plant cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall modifying enzymes. *Journal of Experimental Botany*, **67**, 463-476.
- Cramer, C.L., Bell, J.N., Ryder, T.B., Bailey, J.A., Schuch, W., Bolwell, G.P., Robbins, M.P., Dixon, R.A., Lamb, C.J. 1985. Co-ordinated synthesis of phytoalexin biosynthetic enzymes in biologically-stressed cells of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *The EMBO Journal*, **4**, 285-289.
- Cramer, C.L., Edwards, K., Dron, M., Liang, X., Dildine, S.L., Bolwell, G.P., Dixon, R.A., Lamb, C.J., Schuch, W. 1989. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Molecular Biology*, **12**, 367-383.

- Crawford, N.M.** 1995. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell*, **7**, 859-868.
- Croteau, R., Kolattukudy, P.E.** 1974. Biosynthesis of hydroxyfatty acid polymers. Enzymatic synthesis of cutin from monomer acids by cell-free preparations from the epidermis of *Vicia faba* leaves. *Biochemistry*, **13**, 3193-3202.
- Cuartero, J., Palomares, G., Balasch, S., Nuez, F.** 1981. Tomato fruit cracking under plastic-house and in the open air. II. General and specific combining abilities. En: *Genetics and Breeding of Tomato. Proceedings of the Meeting of the Eucarpia Tomato Working Group*, Avignon-France. 91-98.
- Curvers, K., Seifi, H., Mouille, G., de Rycke, R., Asselbergh, B., Van Hecke, A., Vanderschaeghe, D., Höfte, H., Callewaert, N., Van Breusegem, F., Höfte, M.** 2010. Abscisic acid deficiency causes changes in cuticle permeability and pectin composition that influence tomato resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, **154**, 847-860.
- Czermel, S., Stracke, R., Weisshaar, B., Cordon, N., Harris, N.N., Walker, A.R., Robinson, S.P., Bogs, J.** 2009. The grapevine R2R3-MYB transcription factor *VvMYBFI* regulates flavonol synthesis in developing grape berries. *Plant Physiology*, **151**, 1513-1530.
- Czerednik, A., Busscher, M., Bielen, B.A.M., Wolters-Arts, M., de Maagd, R.A., Angenent, G.C.** 2012. Regulation of tomato fruit pericarp development by an interplay between CDKB and CDKA1 cell cycle genes. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 2605-2617.
- Dastmalchi, M., Dhaubhadel, S.** 2015. Soybean chalcone isomerase: evolution of the fold, and the differential expression and localization of the gene family. *Planta*, **241**, 507-523.
- Dao, T.T.H., Linthorst, H.J.M., Verpoorte, R.** 2011. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews*, **10**, 397-412.
- Davuluri, G.R., van Tuinen, A., Fraser, P.D., Manfredonia, A., Newman, R., Burgess, D., Brummell, D.A., King, S.R., Palys, J., Uhlig, J., Bramley, P.M., Pennings, H.M., Bowler, C.** 2005. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of *DETI* enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nature Biotechnology*, **23**, 890-895.
- deCandolle, A.** 1886. *Origin of cultivated plants*. Hafner Publishing Company, NY.
- de Giorgi, J., Piskurewicz, U., Loubery, S., Utz-Pugin, A., Bailly, C., Mène-Saffrané, L., López-Molina, L.** 2015. An endosperm-associated cuticle is required for Arabidopsis seed viability, dormancy and early control of germination. *PLoS Genetics*, **11**, e1005708.
- Deluc, L., Barrieu, F., Marchive, C., Lauvergeat, V., Decendit, A., Richard, T., Carde, J.P., Méridon, J.M., Hamdi, S.** 2006. Characterization of a grapevine R2R3-MYB Transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology*, **140**, 499-511.

- Demers, D.A., Dorais, M., Papadopoulos, A.P. 2007. Yield and russeting of greenhouse tomato as influenced by leaf-to-fruit ratio and relative humidity. *HortScience*, **42**, 503-507.
- Depège-Fargeix, N., Javelle, M., Chambrier, P., Frangne, N., Gerentes, D., Perez, P., Rogowsky, P.M., Vernoud, V. 2011. Functional characterization of the HD-ZIP IV transcription factor OCL1 from maize. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 293-305.
- Díez, M.J., Nuez, F. 2008. Tomato. En: Prohens-Tomás, J., Nuez, F. (ed). *Vegetables II Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae*. Springer, Heidelberg, 249-323.
- Dixon, R.A., Dey, P.M., Whitehead, I.M. 1982. Purification and properties of chalcone isomerase from cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **715**, 25-33.
- Dixon, R.A., Gerrish, C., Lamb, C.J., Robbins, M.P. 1983. Elicitor-mediated induction of chalcone isomerase in *Phaseolus vulgaris* cell suspension cultures. *Planta*, **159**, 561-569.
- Dobritsa, A.A., Lei, Z., Nishikawa, S., Urbanczyk-Wochniak, E., Huhman, D.V., Preuss, D., Sumner, L.W. 2010. LAP5 and LAP6 encode anther-specific proteins with similarity to chalcone synthase essential for pollen exine development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **153**, 937-55.
- Domínguez, E., Heredia, A. 1999. Water hydration in cutinized cell walls: a physico-chemical analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1426**, 168-176.
- Domínguez, E., López-Casado, G., Cuartero, J., Heredia, A. 2008. Development of fruit cuticle in cherry tomato (*Solanum lycopersicum*). *Functional Plant Biology*, **35**, 403-411.
- Domínguez, E., España, L., López-Casado, G., Cuartero, J., Heredia, A. 2009. Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit cuticles during ripening: the role of flavonoids. *Functional Plant Biology*, **36**, 613-620.
- Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J.A., Benítez, J.J., Heredia, A. 2010. Self-assembly of supramolecular lipid nanoparticles in the formation of plant biopolyester cutin. *Molecular Biosystems*, **6**, 948-950.
- Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J.A., Heredia, A. 2011a. The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytologist*, **189**, 938-949.
- Domínguez, E., Cuartero, J., Heredia, A. 2011b. An overview on plant cuticle biomechanics. *Plant Science*, **181**, 77-84.
- Domínguez, E., Fernández, M.D., López Hernández, J.C., Pérez-Parra, J., España, L., Heredia, A., Cuartero, J. 2012. Tomato fruit continues growing while ripening, affecting cuticle properties and cracking. *Physiologia Plantarum*, **146**, 473-486.
- Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J.A., Heredia, A. 2015a. Plant cutin genesis: unanswered questions. *Trends in Plant Science*, **20**, 551-558.

- Domínguez, E., López-Casado, G., Heredia, A.** 2015b. Role of flavonoids in the cuticle of tomato fruit (*Solanum lycopersicum*). En: Higashide, T. (ed). *Solanum lycopersicum: Production, Biochemistry and Health Benefits*. Nova Publishers, NY, 151-178.
- Dorais, M., Demers, D.A., Papadopoulos, A.P., van Ieperen, W.** 2004. Greenhouse tomato fruit cuticle cracking. *Horticultural Reviews*, **30**, 163-184.
- Duan, D., Fischer, S., Merz, P., Bogs, J., Riemann, M., Nick, P.** 2016. An ancestral allele of grapevine transcription factor MYB14 promotes plant defence. *Journal of Experimental Botany*, **67**, 1795-1804.
- Dumas, Y., Quijada, J. S., Bonafous, M.** 1993. Influence of nitrogen availability on growth and development of tomato plants until fruit-setting. En: Fragoso, M.A.C., van Beusichem, M.L. (eds). *Optimization of Plant Nutrition*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 235-241.
- Durbin, M.L., McCaig, B., Clegg, M.T.** 2000. Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. *Plant Molecular Biology*, **42**, 79-92.
- Eckl, K., Gruler, H.** 1980. Phase transitions in plant cuticles. *Planta*, **150**, 102-113.
- Edahiro, J., Nakamura, M., Seki, M., Furusaki, S.** 2005. Enhanced accumulation of anthocyanin in cultured strawberry cells by repetitive feeding of L-phenylalanine into the medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **99**, 43-47.
- Edelmann, H.G., Neinhuis, C., Bargel, H.** 2005. Influence of hydration and temperature on the rheological properties of plant cuticles and their impact on plant organ integrity. *Journal of Plant Growth Regulation*, **24**, 116-126.
- Ehret, D., Helmer, T., Hall, J.** 1993. Cuticle cracking in tomato fruit. *Journal of Horticultural Science*, **68**, 195-201.
- Eigenbrode, S.D., Jetter, R.** 2002. Attachment to plant surface waxes by an insect predator. *Integrative and Comparative Biology*, **42**, 1091-1099.
- Emmons, C.L.W., Scott, J.W.** 1997. Environmental and physiological effects on cuticle cracking in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **122**, 797-801.
- Emmons, C.L.W., Scott, J.W.** 1998a. Ultrastructural and anatomical factors associated with resistance to cuticle cracking in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *International Journal of Plant Sciences*, **159**, 14-22.
- Emmons, C.L.W., Scott, J.W.** 1998b. Diallel analysis of resistance to cuticle cracking in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **123**, 67-72.
- Esau, K.** 1977. *Anatomy of seed plants* (2ª edición). John Wiley & Sons, NY.



- España, L.** 2012. El papel de los flavonoides en las propiedades biomecánicas de la cutícula del fruto de tomate. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica (Málaga: Universidad de Málaga).
- España, L., Heredia-Guerrero, J.A., Reina-Pinto, J.J., Fernández-Muñoz, R., Heredia, A., Domínguez, E.** 2014b. Transient silencing of *CHALCONE SYNTHASE* during fruit ripening modifies tomato epidermal cells and cuticle properties. *Plant Physiology*, **166**, 1371-1386.
- España, L., Heredia-Guerrero, J.A., Segado, P., Benítez, J.J., Heredia, A., Domínguez, E.** 2014a. Biomechanical properties of tomato fruit cuticle during development are modulated by changes in the relative amount of their components. *New Phytologist*, **202**, 790-802.
- Esquinas-Alcázar, J., Nuez-Viñals, F.** 1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. En: Nuez, F. (ed). *El cultivo del tomate*. Mundi-Prensa, Madrid, 11-42.
- Evans, M.M., Passas, H.J., Poethig, R.S.** 1994. Heterochronic effects of glossy15 mutations on epidermal cell identity in maize. *Development*, **120**, 1971-1981.
- Expósito-Rodríguez, M., Borges, A.A., Borges-Pérez, A., Pérez, J.A.** 2008. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology*, **8**, 131.
- Fabre, G., Garroum, I., Mazurek, S., Daraspe, J., Mucciolo, A., Sankar, M., Humbel, B.M., Nawrath, C.** 2016. The ABCG transporter PEC1/ABCG32 is required for the formation of the developing leaf cuticle in Arabidopsis. *New Phytologist*, **209**, 192-201.
- F.A.O.** 2010. *Plant genetic resource for food and agriculture* (2<sup>nd</sup> report). Commission on genetic resources for food and agriculture, FAO, Roma.
- Fernández, V., Eichert, T.** 2009. Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **28**, 36-68.
- Ferrer, J.L., Austin, M.B., Stewart, C., Noel, J.P.** 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 356-370.
- Ferrer, J.L., Jez, J.M., Bowman, M.E., Dixon, R.A., Noel, J.P.** 1999. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural Biology*, **6**, 775-784.
- Ferreira, M.L.F., Emiliani, J., Rodriguez, E.J., Campos-Bermudez, V.A., Grotewold, E., Casati, P.** 2015. The identification of maize and Arabidopsis type I flavone synthases links flavones with hormones and biotic interactions. *Plant physiology*, **169**, 1090-1107.

- Fiebig, A., Mayfield, J.A., Miley, N.L., Chau, S., Fischer, R.L., Preuss, D.** 2000. Alterations in *CER6*, a gene identical to *CUT1*, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems. *The Plant Cell*, **12**, 2001-2008.
- Fiorani, F., Umbach, A.L., Siedow, J.N.** 2005. The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of Arabidopsis AOX1a transgenic plants. *Plant Physiology*, **139**, 1795-1805.
- Foley, J.A., Ramankutty, N., Brauman, K.A., Cassidy, E.S., Gerber, J.S., Johnston, M., Mueller, N.D., O'Connell, C., Ray, D.K., West, P.C., Balzer, C., Bennett, E.M., Carpenter, S.R., Hill, J., Monfreda, C., Polasky, S., Rockström, J., Sheehan, J., Siebert, S., Tilman, D., Zaks, D.P.** 2011. Solutions for a cultivated planet. *Nature*, **478**, 337-342.
- Foolad, M. R.** 2007. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, **2007**, 64358.
- Forkmann, G., Heller, W.** 1999. Biosynthesis of flavonoids. En: Sankawa, U. (ed). *Comprehensive Natural Products Chemistry*, vol. 1. *Polyketides and other secondary metabolites including fatty acid and their derivatives*. Elsevier, Oxford, 713-748.
- Franke, R., Briesen, I., Wojciechowski, T., Faust, A., Yephremov, A., Nawrath, C., Schreiber, L.** 2005. Apoplastic polyesters in Arabidopsis surface tissues—a typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry*, **66**, 2643-2658.
- Frary, A., Nesbitt, T.C., Grandillo, S., Knaap, E., Cong, B., Liu, J., Meller, J., Elber, R., Alpert, K.B., Tanksley, S.D.** 2000. fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science*, **289**, 85-88.
- Frazier, W., Bowers, J.L.** 1947. A final report on studies of tomato fruit cracking in Maryland. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, **49**, 241-255.
- Freile-Pelegrín, Y., Robledo, D.** 2014. Bioactive phenolic compounds from algae. En: Hernández-Ledesma, B., Herrero, M. (eds). *Bioactive compounds from marine foods: plant and animal sources*. John Wiley & Sons, Chichester, 113-129.
- Frías-Moreno, N., Nuñez-Barríos, A., Perez-Leal, R., González-Franco, A.C., Hernández-Rodríguez, A., Robles-Hernández, L.** 2014. Effect of nitrogen deficiency and toxicity in two varieties of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* L.). *Agricultural Sciences*, **5**, 1361-1368.
- Friedman, M.** 2002. Tomato glycoalkaloids: Role in the plant and in the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5751-5780.
- Fritz, C., Palacios-Rojas, N., Feil, R., Stitt, M.** 2006 Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal*, **46**, 533-548.

- Fujisawa, M., Shima, Y., Higuchi, N., Nakano, T., Koyama, Y., Kasumi, T., Ito, Y. 2012. Direct targets of the tomato-ripening regulator *RIN* identified by transcriptome and chromatin immunoprecipitation analyses. *Planta*, **235**, 1107-1122.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P., Sutton, M.A. 2008. Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, **320**, 889-892.
- García-Luis, A., Duarte, A., Porras, I., García-Lidón, A., Guardiola, J.L. 1994. Fruit splitting in 'Nova' hybrid mandarin in relation to the anatomy of the fruit and fruit set treatments. *Scientia Horticulturae*, **57**, 215-231.
- Gautier, H., Diakou-Verdin, V., Bénard, C., Reich, M., Buret, M., Bourgaud, F., Poëssel, J.L., Caris-Veyrat, C., Génard, M. 2008. How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 1241-1250.
- Gebhardt, Y.H., Witte, S., Steuber, H., Matern, U., Martens, S. 2007. Evolution of flavone synthase I from parsley flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase by site-directed mutagenesis. *Plant physiology*, **144**, 1442-1454.
- Gensheimer, M. y Mushegian, A. 2004. Chalcone isomerase family and fold: No longer unique to plants. *Protein Science*, **13**, 540-544.
- Gerrish, C., Robbins, M.P., Dixon, R.A. 1985. Trans-cinnamic acid as a modulator of chalcone isomerase in bean cell suspension cultures. *Plant Science*, **38**, 23-27.
- Gillaspy, G., Ben-David, H., Gruissem, W. 1993. Fruits: a developmental perspective. *The Plant Cell*, **5**, 1439-1451.
- Giménez, E., Domínguez, E., Pineda, B., Heredia, A., Moreno, V., Lozano, R., Angosto, T. 2015. Transcriptional activity of the MADS-box *ALQ/TAGL1* gene is required for cuticle development of tomato fruit. *Plant Physiology*, **168**, 1036-1048.
- Giménez, E., Pineda, B., Capel, J., Antón, M.T., Atarés, A., Pérez-Martín, F., García-Sogo, B., Angosto, T., Moreno, V., Lozano, R. 2010. Functional analysis of the Arlequin mutant corroborates the essential role of the Arlequin/TAGL1 gene during reproductive development of tomato. *PLoS ONE*, **5**, e14427.
- Giovinazzo, G., D'Amico, L., Paradiso, A., Bollini, R., Sparvoli, F., DeGara, L. 2005. Antioxidant metabolite profiles in tomato fruit constitutively expressing the grapevine stilbene synthase gene. *Plant Biotechnology Journal*, **3**, 57-69.
- Girard, A.L., Mounet, F., Lemaire-Chamley, M., Gaillard, C., Elmorjani, K., Vivancos, J., Runavot, J.L., Quemener, B., Petit, J., Germain, V., Rothan, C., Marion, D., Bakan, B. 2012. Tomato GDSL1 is required for cutin deposition in the fruit cuticle. *The Plant Cell*, **24**, 3119-3134.

- Go, Y.S., Kim, H., Kim, H.J., Suh, M.C. 2014. *Arabidopsis* cuticular wax biosynthesis is negatively regulated by the *DEWAX* gene encoding an AP2/ERF-type transcription factor. *The Plant Cell*, **26**, 1666-1680.
- Goiris, K., Muylaert, K., Voorspoels, S., Noten, B., De Paepe, D., Baart, G.J.E., De Cooman, L. 2014. Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *Journal of Phycology*, **50**, 483-492.
- Gómez, C., Conejero, G., Torregrosa, L., Cheynier, V., Terrier, N., Ageorges, A. 2011. In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. *The Plant Journal*, **67**, 960-970.
- Gonzalez, N., Gévaudant, F., Hernould, M., Chevalier, C., Mouras, A. 2007. The cell cycle-associated protein kinase WEE1 regulates cell size in relation to endoreduplication in developing tomato fruit. *The Plant Journal*, **51**, 642-655.
- Gorb, E., Haas, K., Henrich, A., Enders, S., Barbakadze, N., Gorb, S. 2004. Composite structure of the crystalline epicuticular wax layer of the slippery zone in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* and its effect on insect attachment. *Journal of Experimental Biology*, **208**, 4651-4662.
- Graf, B.A., Milbury, P.E., Blumberg, J.B. 2005. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *Journal of Medicinal Food*, **8**, 281-290.
- Graham, L.E. 1993. *Origin of land plants*, John Wiley&Sons, Nueva York.
- Graham, L.E., Wilcox, L.W., Cook, M.E., Gensel, P.G. 2004. Resistant tissues of marchantioid liverworts resemble enigmatic early Paleozoic microfossils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 11025-11029.
- Gray, J.E., Holroyd, G.H., van der Lee, F.M., Bahrami, A.R., Sijmons, P.C., Woodward, F.I., Schuch, W., Hetherington, A.M. 2000. The HIC signalling pathway links CO<sub>2</sub> perception to stomatal development. *Nature*, **408**, 713-716.
- Groenenboom, M., Gomez-Roldan, V., Stigter, H., Astola, L., van Daelen, R., Beekwilder, J., Bovy, A., Hall, R., Molenaar, J. 2013. The flavonoid pathway in tomato seedlings: transcript abundance and the modeling of metabolite dynamics. *PLoS ONE*, **8**, e68960.
- Gruber, N., Galloway, J.N. 2008. An earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, **451**, 293-296.
- Guidi, L., Lorefice, G., Pardossi, A., Malorgio, F., Tognoni, F., Soldatini, G. 1997. Growth and photosynthesis of *Lycopersicon esculentum* (L.) plants as affected by nitrogen deficiency. *Biologia Plantarum*, **40**, 235-244.
- Halbrooks, M., Wilcox, G. 1980. Tomato plant development and elemental accumulation. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **105**, 826-828.

- Hamilton, R.J.** 1995. *Waxes: chemistry, molecular biology and functions*. The Oily Press, Dundee.
- Han, Y., Ding, T., Su, B., Jiang, H.** 2016. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the chalcone synthase family in maize. *International Journal of Molecular Science*, **17**, 161.
- Hannah, M.A., Wiese, D., Freund, S., Fiehn, O., Heyer, A.G., Hinch, D.K.** 2006. Natural genetic variation of freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **142**, 98-112.
- Hashimoto, T., Hayashi, A., Amano, Y., Kohno, J., Iwanari, H., Usuda, S., Yamada, Y.** 1991. Hyoscyamine 6 beta-hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized at the pericycle of the root. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 4648-4653.
- Hassan, S., Mathesius, U.** 2012. The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 3429-3444.
- Hegg, E.L., Que, L.** 1997. The 2-His-1-carboxylate facial triad--an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *European journal of Biochemistry*, **250**, 625-629.
- Hellemans, J., Mortier, G., de Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J.** 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, **8**, R19.
- Hen-Avivi, S., Lashbrooke, J., Costa, F., Aharoni, A.** 2014. Scratching the surface: genetic regulation of cuticle assembly in fleshy fruit. *Journal of Experimental Botany*, **65**, 4653-4664.
- Henriques, R., Bögre, L., Horváth, B., Magyar, Z.** 2014. Balancing act: matching growth with environment by the TOR signalling pathway. *Journal of Experimental Botany*, **65**, 2691-2701.
- Heredia, A.** 2003. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1620**, 1-7.
- Heredia, A., Domínguez, E.** 2009. The plant cuticle: a complex lipid barrier between the plant and the environment. An overview. En: Dishovsky, C., Pivovarov, A. (eds). *Counteraction to Chemical and Biological Terrorism in East European Countries*. Nato Series, Springer Verlag, Dordrecht, 109-116.
- Heredia, A., Heredia-Guerrero, J.A., Domínguez, E.** 2015. *CHS* silencing suggests a negative cross-talk between wax and flavonoid pathways in tomato fruit cuticle. *Plant Signaling and Behavior*, **10**, 5, e1019979

- Heredia-Guerrero, J.A., Benítez, J.J., Heredia, A.** 2008. Self-assembled polyhydroxy fatty acids vesicles: a mechanism for plant cutin synthesis. *Bioessays*, **30**, 273-277.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I.** 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, Circular 347. College of Agriculture, Berkley, CA.
- Hoang, V.L., Innes, D.J., Shaw, P.N., Monteith, G.R., Gidley, M.J., Dietzgen, R.G.** 2015. Sequence diversity and differential expression of major phenylpropanoid-flavonoid biosynthetic genes among three mango varieties. *BMC Genomics*, **16**, 561.
- Hodek, P., Trefil, P., Stiborová, M.** 2002. Flavonoid-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, **139**, 1-21.
- Holloway, P.** 1982. The chemical constitution of plant cutins. En: Cutler, D.F., Alvin, K.L., Price, C.E (eds). *The Plant Cuticle*. Academic Press, Londres, 45-85.
- Hong, J.K., Choi, H.W., Hwang, I.S., Kim, D.S., Kim, N.H., Choi, D.S., Kim, Y.J., Hwang, B.K.** 2008. Function of a novel GDSL-type pepper lipase gene, CaGLIP1, in disease susceptibility and abiotic stress tolerance. *Planta*, **227**, 539-558.
- Hovav, R., Chehanovsky, N., Moy, M., Jetter, R., Schaffer, A.A.** 2007. The identification of a gene (*Cwp1*), silenced during Solanum evolution, which causes cuticle microfissuring and dehydration when expressed in tomato fruit. *The Plant Journal*, **52**, 627-639.
- Huang, X., Wang, H., Gao, F., Huang, H.** 1999. A comparative study of the pericarp of litchi cultivars susceptible and resistant to fruit cracking. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **74**, 351-354.
- Huett, D.** 1986. Response to nitrogen and potassium of tomatoes grown in sand culture. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **26**, 133-138.
- Hull, H.M., Morton, H.L., Wharrie, J.R.** 1975. Environmental influences on cuticle development and resultant foliar penetration. *The Botanical Review*, **41**, 421-452.
- Hunneman, D.H., Eglinton, G.** 1972. The constituents acids of gymnosperm cutins. *Phytochemistry*, **11**, 1989-2001.
- Hunt, G.M., Baker, E.A.** 1980. Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry*, **19**, 1415-1419.
- Ichino, T., Fuji, K., Ueda, H., Takahashi, H., Koumoto, Y., Takagi, J., Tamura, K., Sasaki, R., Aoki, K., Shimada, T., Hara-Nishimura, I.** 2014. GFS9/TT9 contributes to intracellular membrane trafficking and flavonoid accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **80**, 410-423.

- Iijima, Y., Nakamura, Y., Ogata, Y., Tanaka, K.I., Sakurai, N., Suda, K., Suzuki, T., Suzuki, H., Okazaki, K., Kitayama, M., Kanaya, S., Aoki, K., Shibata, D. 2008. Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information. *The Plant Journal*, **54**, 949-962.
- Ingham, D.J., Beer, S., Money, S., Hansen, G. 2001. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *Biotechniques*, **31**, 132-140.
- Ingresso, I., Bonsegna, S., De Domenico, S., Laddomada, B., Blando, F., Santino, A., Giovino, G. 2011. Over-expression of a grape stilbene synthase gene in tomato induces parthenocarp and causes abnormal pollen development. *Plant Physiology and Biochemistry*, **49**, 1092-1099.
- Isaacson, T., Kosma, D.K., Matas, A.J., Buda, G.J., He, Y., Yu, B., Pravitari, A., Batteas, J.D., Stark, R.E., Jenks, M.A., Rose, J.K.C. 2009. Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *The Plant Journal*, **60**, 363-377.
- Iqbal, N., Trivellini A., Masood A., Ferrante, A., Khan, N.A. 2013. Current understanding on ethylene signaling in plants: the influence of nutrient availability. *Plant Physiology and Biochemistry*, **73**, 128-138.
- Ito, M., Ichinose, Y., Kato, H., Shiraishi, T., Yamada, T. 1997. Molecular evolution and functional relevance of the chalcone synthase genes of pea. *Molecular & General Genetics*, **255**, 28-37.
- Jaganath, I.B., Crozier, A. 2010. Dietary flavonoids and phenolic compounds. En: Fraga, C.G. (ed). *Plant phenolics and human health*. Wiley, Nueva Jersey, 1-49.
- Jakobson, L., Lindgren, L.O., Verdier, G., Laanemets, K., Brosché, M., Beisson, F., Kollist, H. 2016. *BODYGUARD* is required for the biosynthesis of cutin in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, **211**, 614-626.
- Jasiński, M., Kachlicki, P., Rodziewicz, P., Figlerowicz, M., Stobiecki, M. 2009. Changes in the profile of flavonoid accumulation in *Medicago truncatula* leaves during infection with fungal pathogen *Phoma medicaginis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **47**, 847-853.
- Javelle, M., Vernoud, V., Rogowsky, P.M., Ingram, G.C. 2010a. Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytologist*, **189**, 17-39.
- Javelle, M., Vernoud, V., Depège-Fargeix, N., Arnould, C., Oursel, D., Domergue, F., Sarda, X., Rogowsky, P.M. 2010b. Overexpression of the epidermis-specific homeodomain-leucine zipper IV transcription factor OUTER CELL LAYER1 in maize identifies target genes involved in lipid metabolism and cuticle biosynthesis. *Plant Physiology*, **154**, 273-286.

- Jeffree, C.E.** 2006. The fine structure of the plant cuticle. En: Riederer, M., Müller, C. (eds), *Biology of the plant cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford., 11-125.
- Jenkins, J.A.** 1948. The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, **2**, 379-392.
- Jepson, C., Karppinen, K., Daku, R.M., Sterenberg, B.T., Suh, D.Y.** 2014. *Hypericum perforatum* hydroxyalkylpyrone synthase involved in sporopollenin biosynthesis--phylogeny, site-directed mutagenesis, and expression in nonanther tissues. *The FEBS Journal*, **281**, 3855-68.
- Jetter, R., Riederer, M.** 2016. Localization of the transpiration barrier in the epi- and intracuticular waxes of eight plant species: water transport resistances are associated with fatty acyl rather than alicyclic components. *Plant Physiology*, **170**, 921-934.
- Jez, J.M., Bowman, M.E., Dixon, R.A., Noel, J.P.** 2000a. Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. *Nature Structural Biology*, **7**, 786-791.
- Jez, J.M., Ferrer, J.L., Bowman, M.E., Dixon, R.A., Noel, J.P.** 2000b. Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry*, **39**, 890-902.
- Jiang, Y., Joyce, D.C.** 2003. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regulation*, **39**, 171-174.
- Jiang, W., Yin, Q., Wu, R., Zheng, G., Liu, J., Dixon, R.A., Pang, Y.** 2015. Role of a chalcone isomerase-like protein in flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 7165-7179.
- Johnson, C.S., Kolevski, B., Smyth, D.R.** 2002. TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *The Plant Cell*, **14**, 1359-1375.
- Joos, H.J., Hahlbrock, K.** 1992. Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L.). Genomic complexity, structural comparison of two selected genes and modes of expression. *European Journal of Biochemistry*, **204**, 621-629.
- Josan, J., Sandhu, A., Singh, R., Monga, P.** 1995. Effect of various nutrient sprays on the fruit quality of lemon. *Indian Journal of Horticulture*, **52**, 288-290.
- Ju, Z., Bramlage, W.J.** 1999. Phenolics and lipid-soluble antioxidants in fruit cuticle of apples and their antioxidant activities in model systems. *Postharvest Biology and Technology*, **16**, 107-118.
- Kang, J.H., McRoberts, J., Shi, F., Moreno, J.E., Jones, A.D., Howe, G.A.** 2014. The flavonoid biosynthetic enzyme chalcone isomerase modulates terpenoid production in glandular trichomes of tomato. *Plant Physiology*, **164**, 1161-1174.



- Kaniszewski, S.; Elkner, K.; Rumpel, J.** 1987. Effect of nitrogen fertilization and irrigation on yield, nitrogen status in plants and quality of fruits of direct seeded tomatoes. *Acta Horticulturae*, **200**, 195-202.
- Kannangara, R., Branigan, C., Liu, Y., Penfield, T., Rao, V., Mouille, G., Höfte, H., Pauly, M., Riechmann, J.L., Broun, P.** 2007. The transcription factor *WIN1/SHN1* regulates cutin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, **19**, 1278-1294.
- Karlova, R., Rosin, F.M., Busscher-Lange, J., Parapunova, V., Do, P.T., Fernie, A.R., Fraser, P.D., Baxter, C., Angenent, G.C., de Maagd, R.A.** 2011. Transcriptome and metabolite profiling show that *APETALA2a* is a major regulator of tomato fruit ripening. *The Plant Cell*, **23**, 923-941.
- Karppinen, K., Hohtola, A.** 2008. Molecular cloning and tissue-specific expression of two cDNAs encoding polyketide synthases from *Hypericum perforatum*. *Journal of Plant Physiology*, **165**, 1079-1086.
- Kavanová, M., Lattanzi, F.A., Schnyder, H.** 2008. Nitrogen deficiency inhibits leaf blade growth in *Lolium perenne* by increasing cell cycle duration and decreasing mitotic and post-mitotic growth rates. *Plant Cell Environ.***31**, 727-737.
- Kawai, Y., Ono, E., Mizutani, M.** 2014. Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *The Plant Journal* **78**, 328-343.
- Kerstiens, G.** 1996a. Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of Experimental Botany*, **47**, 1813-1832.
- Kerstiens, G.** 1996b. Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure-function relationships. *Trends in Plant Science*, **1**, 125-129.
- Kerstiens, G.** 2006. Water transport in plant cuticles: an update. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 2493-2499.
- Khan, M.I.R., Trivellini, A., Fatma, M., Masood, A., Francini, A., Iqbal, N., Ferrante, A., Khan, N.A.** 2015. Role of ethylene in responses of plants to nitrogen availability. *Trends in Plants in Science*, **6**, 927.
- Khanal, B.P., Grimm, E., Knoche, M.** 2011. Fruit growth, cuticle deposition, water uptake, and fruit cracking in jostaberry, gooseberry, and black currant. *Scientia Horticulturae*, **128**, 289-296.
- Khanal, B.P., Grimm, E., Finger, S., Blume, A., Knoche, M.** 2013. Intracuticular waxes fix and restrict strain in leaf and fruit cuticles. *New Phytologist*, **200**, 134-143.
- Kiba, T., Kudo, T., Kojima, M., Sakakibara, H.** 2011. Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 1399-1409.

- Kim, H.B., Oh, C.J., Lee, H., An, C.S.** 2003. A type-I chalcone isomerase mRNA is highly expressed in the root nodules of *Elaeagnus umbellata*. *Journal of Plant Biology*, **46**, 263-270.
- Kim, S.S., Grienberger, E., Lallemand, B., Colpitts, C.C., Kim, S.Y., de Azevedo Souza, C., Geoffroy, P., Heintz, D., Krahn, D., Kaiser, M., Kombrink, E., Heitz, T., Suh, D.-Y., Legrand, M., Douglas, C.J.** 2010. LAP6/POLYKETIDE SYNTHASE A and LAP5/POLYKETIDE SYNTHASE B encode hydroxyalkyl a-pyrone synthases required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **22**, 4045–4066.
- Kimura, Y., Aoki, T., Ayabe, S.** 2001. Chalcone isomerase isozymes with different substrate specificities toward 6'-hydroxy and 6'-deoxychalcones in cultured cells of *Glycyrrhiza echinata*, a leguminous plant producing 5'-deoxyflavonoids. *Plant Cell Physiology*, **42**, 1169-1173.
- Kliebenstein, D.J.** 2004. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant Cell and Environment*, **27**, 675–684.
- Knoche, M., Peschel, S.** 2007a. Deposition and strain of the cuticle of developing European plum fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **132**, 597-602.
- Knoche, M., Peschel, S.** 2007b. Gibberellins increase cuticle deposition in developing tomato fruit. *Plant Growth Regulation*, **51**, 1-10.
- Knoche, M., Beyer, M., Peschel, S., Oparlakov, B., Bukovac, M.J.** 2004. Changes in strain and deposition of cuticle in developing sweet cherry fruit. *Physiologia Plantarum*, **120**, 667-677.
- Kobryn, J., Hallmann, E.** 2005. The effect of nitrogen fertilization on the quality of three tomato types cultivated on rockwool. *Acta Horticulturae*, **691**, 341-348.
- Koch, K., Barthlott W.** 2009. Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, **367**, 1487-1509.
- Koduri, P.K., Gordon, G.S., Barker, E.I., Colpitts, C.C., Ashton, N.W., Suh, D.Y.** 2010. Genome-wide analysis of the chalcone synthase superfamily genes of *Physcomitrella patens*. *Plant Molecular Biology*, **72**, 247–263.
- Koes, R.E., Spelt, C.E., van den Elzen, P.J.M., Mol, J.N.M.** 1989a. Cloning and molecular characterization of the chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida*. *Gene*, **81**, 245-257.
- Koes, R.E., Spet, C.E., Mol, J.N.** 1989b. The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V30): differential, light-regulated expression during flower development and UV light induction. *Plant Molecular Biology*, **12**, 213-225.

- Koes, R.E., van Blokland, R., Quattrocchio, F., van Tunen, A.J., Mol, J.N.** 1990. Chalcone synthase promoters in *Petunia* are active in pigmented and unpigmented cell types. *Plant Cell*, **2**, 379–392.
- Kögel-Knabner, I., de Leeuw, J.W., Tegelaar, E.W., Hatcher, P.G., Kerp, H.** 1994. A lignin-like polymer in the cuticle of spruce needles: implications for the humification of spruce litter. *Organic Geochemistry*, **21**, 1219-1228.
- Kolattukudy, P.** 1980. Cutin, suberin, and waxes. En: Stumpf, P.K. (ed). *The biochemistry of plants vol. 4. Lipids: structure and function*. Academic Press, NY, 571-645.
- Kosma, D.K., Bourdenx, B., Bernard, A., Parsons, E.P., Lü, S., Joubès, J., Jenks, M.A.** 2009. The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **151**, 1918-1929.
- Koyama, K., Ikeda, H., Poudel, P.R., Goto-Yamamoto, N.** 2012. Light quality affects flavonoid biosynthesis in young berries of Cabernet Sauvignon grape. *Phytochemistry*, **78**, 54-64.
- Koyama, K., Numata, M., Nakajima, I., Goto-Yamamoto, N., Matsumura, H., Tanaka, N.** 2014. Functional characterization of a new grapevine MYB transcription factor and regulation of proanthocyanidin biosynthesis in grapes. *Journal of Experimental Botany*, **65**, 4433-4449.
- Krapp, A., David L.C., Chardin, C., Girin, T., Marmagne, A., Leprince, A.S., Chaillou, S., Ferrario-Méry, S., Meyer, C., Daniel-Vedele, F.** 2014. Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, **65**, 789-798.
- Kumar, A., Ellis, B.E.** 2001. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution. *Plant Physiology*, **127**, 230-239.
- Kurdyukov, S., Faust, A., Nawrath, C., Bär, S., Voisin, D., Efremova, N., Franke, R., Schreiber, L., Saedler, H., Métraux, J.P., Yephremov, A.** 2006. The epidermis-specific extracellular *BODYGUARD* controls cuticle development and morphogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **18**, 321-339.
- Laffont, C., Blanchet, S., Lapierre, C., Brocard, L., Ratet, P., Crespi, M., Mathesius, U., Frugier, F.** 2010. The compact root architecture1 gene regulates lignification, flavonoid production, and polar auxin transport in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, **105**, 491-498.
- Lanz, T., Tropf, S., Marnier, F.J., Schröder, J., Schröder, G.** 1991. The role of cysteines in polyketide synthases. Site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthases, two key enzymes in different plant-specific pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, 9971-9976.
- Lara, I., Belge, B., Goulao, L.F.** 2014. The fruit cuticle as a modulator of postharvest quality. *Postharvest Biology and Technology*, **87**, 103-112.

- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947-2948.
- Lashbrooke, J., Adato, A., Lotan, O., Alkan, N., Tsimbalist, T., Rechav, K., Fernandez-Moreno, J.P. Widemann, E., Grausem, B., Pinot, F., Granell, A., Costa, F., Aharoni, A. 2015. The tomato MIXTA-like transcription factor coordinates fruit epidermis conical cell development and cuticular lipid biosynthesis and assembly. *Plant physiology*, **169**, 2553-2571.
- Lavola, A. 1998. Accumulation of flavonoids and related compounds in birch induced by UV-B irradiance. *Tree Physiology*, **18**, 53-58.
- Lea, U.S., Slimestad, R., Smedvig, P., Lillo, C. 2007. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta*, **225**, 1245-1253.
- Le Bot, J., Jeannequin, B., Fabre, R. 2001. Impacts of N-deprivation on the yield and nitrogen budget of rockwool grown tomatoes. *Agronomie, EDP Sciences*, **21**, 341-350.
- Leide, J., Hildebrandt, U., Reussing, K., Riederer, M., Vogg, G. 2007. The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: effects of a deficiency in a  $\beta$ -ketoacyl-coenzyme A synthase (LeCER6). *Plant Physiology*, **144**, 1667-1679.
- Lemaire-Chamley, M., Petit, J., Garcia, V., Just, D., Baldet, P., Germain, V., Fagard, M., Mouassite, M., Cheniclet, C., Rothan, C. 2005. Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiology*, **139**, 750-769.
- Leonardi, C., Guichard, S., Bertin, N. 2000. High vapour pressure deficit influences growth, transpiration and quality of tomato fruits. *Scientia Horticulturae*, **84**, 285-296.
- Letard, M., Erard, P., Jeannequin, B. 1995. Maitrise de l'irrigation fertilisante. *Tomate sous serre et abris en sol et hors sol*. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Legumes: Paris, France, 217.
- Leveau, J.H.J. 2006. Microbial communities in the phyllosphere. En: Riederer, M., Müller, C. (eds). *Biology of the plant cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, 334-367.
- L'Haridon, F., Besson-Bard, A., Binda, M., Serrano, M., Abou-Mansour, E., Balet, F., Schoonbeek, H.J., Hess, S., Mir, R., Léon, J., Lamotte, O., Métraux, J.P. 2011. A permeable cuticle is associated with the release of reactive oxygen species and induction of innate immunity. *PLoS Pathology*, **7**, e1002148.
- Li, J., Ou-Lee, T.M., Raba, R., Amundson, R.G., Last, R.L. 1993. Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *The Plant Cell*, **5**, 171-179.

- Li-Beisson, Y., Pollard, M., Sauveplane, V., Pinot, F., Ohlrogge, J., Beisson, F. 2009. Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 22008-22013.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M.X., Arondel, V., Bates, P.D., Baud, S., Bird, D., DeBono, A., Durrett, T.P., Franke, R.B., Graham, I.A., Katayama, K., Kelly, A.A., Larson, T., Markham, J.E., Miquel, M., Molina, I., Nishida, I., Rowland, O., Samuels, L., Schmid, K.M., Wada, H., Welti, R., Xu, C., Zallot, R., Ohlrogge, J. 2013. Acyl-lipid metabolism. *The Arabidopsis Book*, **11**, e0161.
- Licausi, F., Ohme-Takagi, M., Perata, P. 2013. APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytologist*, **199**, 639-649.
- Lichter, A., Dvir, O., Fallik, E., Cohen, S., Golan, R., Shemer, Z., Sagi, M. 2002. Cracking of cherry tomatoes in solution. *Postharvest Biology and Technology*, **26**, 305-312.
- Lillo, C., Lea, U.S., Ruoff, P. 2008. Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, Cell & Environment*, **31**, 587-601.
- Linneo, C. 1753. *Species Plantarum*. Laurentius Salvius, Estocolmo.
- Lippold, F., Sánchez, D.H., Musialak, M., Schlereth, A., Scheible, W.R., Hinch, D.K., Udvardi, M.K. 2009. *AtMyb41* regulates transcriptional and metabolic responses to osmotic stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **149**, 1761-1772.
- 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.
- Lolle, S.J., Berlyn, G.P., Engstrom, E.M., Krolkowski, K.A., Reiter, W.D., Pruitt, R.E. 1997. Developmental regulation of cell interactions in the *Arabidopsis fiddlehead-1* mutant: a role for the epidermal cell wall and cuticle. *Developmental Biology*, **189**, 311-321.
- López-Casado, G.M. 2006. Biomecánica de la epidermis y la cutícula del fruto de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y su relación con el agrietado. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica (Málaga: Universidad de Málaga).
- López-Casado, G.M., Matas, A.J., Domínguez, E., Cuartero, J., Heredia, A. 2007. Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit cuticles: the role of the cutin matrix and polysaccharides. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 3875-3883.
- López-Casado, G., Covey, P.A., Bedinger, P.A., Mueller, L.A., Thannhauser, T.W., Zhang, S., Fei, Z., Giovannoni, J.J., Rose, J.K. 2012. Enabling proteomic studies with RNA-Seq: The proteome of tomato pollen as a test case. *Proteomics*, **12**, 761-774.

- Løvdal, T., Olsen, K.M., Slimestad, R., Verheul, M., Lillo, C. 2010. Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry*, **71**, 605-613.
- Lozano, R., Gimenez, E., Cara, B., Capel, J., Angosto, T. 2009. Genetic analysis of reproductive development of tomato. *The International Journal of Developmental Biology*, **53**, 1635-1648.
- Lukačín, R., Britsch, L. 1997. Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase. *European Journal of Biochemistry*, **249**, 748-757.
- Lukačín, R., Gröning, I., Pieper, U., Matern, U. 2000. Site-directed mutagenesis of the active site serine290 in flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase from *Petunia hybrida*. *European Journal of Biochemistry*, **267**, 853-860.
- Lunn, D., Phan, T.D., Tucker, G.A., Lycett, G.W. 2013. Cell wall composition of tomato fruit changes during development and inhibition of vesicle trafficking is associated with reduced pectin levels and reduced softening. *Plant Physiology and Biochemistry*, **66**, 91-97.
- Luo, J., Butelli, E., Hill, L., Parr, A., Niggeweg, R., Bailey, P., Weisshaar, B., Martin, C. 2008. AtMYB12 regulates caffeoyl quinic acid and flavonolsynthesis in tomato: expression in fruit results in veryhigh levels of both types of polyphenol. *The Plant Journal*, **56**, 316-326.
- Luo, B., Xue, X.Y., Hu, W.L., Wang, L.J., and Chen, X.Y. 2007. An ABC transporter gene of *Arabidopsis thaliana*, AtWBC11, is involved in cuticle development and prevention of organ fusion. *Plant Cell Physiology*, **48**, 1790-1802.
- Luque, P., Bruque, S., Heredia, A. 1995a. Water permeability of isolated cuticular membranes: a structural analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **317**, 417-422.
- Luque, P., Gavara, R., Heredia, A. 1995b. A study of the hydration process of isolated cuticular membranes. *New Phytologist*, **129**, 283-288.
- Luza, J.G., van Gorsel, R., Polito, V.S., Kader, A.A. 1992. Chilling injury in peaches: a cytochemical and ultrastructural cell wall study. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **117**, 114-118.
- Maddison, W.P., Maddison, D.R. 2017. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.2. <http://mesquiteproject.org>
- Mahjoub, A., Hernould, M., Joubès, J., Decendit, A., Mars, M., Barrieu, F., Hamdi, S., Delrot, S. 2009. Overexpression of a grapevine R2R3-MYB factor in tomato affects vegetative development, flower morphology and flavonoid and terpenoid metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, **47**, 551-561.

- Maloney, G.S., DiNapoli, K.T., Muday, G.K.** 2014. The anthocyanin reduced tomato mutant demonstrates the role of flavonols in tomato lateral root and root hair development. *Plant Physiology*, **166**, 614-631.
- Malundo, T., Shewfelt, R., Scott, J.** 1995. Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest Biology and Technology*, **6**, 103-110.
- Marais, J.P.J., Deavours, B., Dixon, R.A., Ferreira, D.** 2006. The stereochemistry of flavonoids. En: Grotewold, E. (ed). *The Science of Flavonoids*. Springer, Nueva York, 1-46.
- Margna, U.** 1977. Control at the level of substrate supply—an alternative in the regulation of phenylpropanoid accumulation in plant cells. *Phytochemistry*, **16**, 419-426.
- Marschner, H.** 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. 2ª edición. Academic Press, Londres.
- Martens, S., Forkmann, G.** 1999. Cloning and expression of flavone synthase II from Gerbera hybrids. *The Plant Journal*, **20**, 611-618.
- Martin, L.B., Rose, J.K.** 2014. There's more than one way to skin a fruit: formation and functions of fruit cuticles. *Journal of Experimental Botany*, **65**, 4639-4651.
- Martínez, S., Hausinger, R.P.** 2015. Catalytic mechanisms of Fe(II)- and 2-oxoglutarate-dependent oxygenases. *The Journal of Biological Chemistry*, **290**, 20702-20711.
- Martínez-Lüscher, J., Torres, N., Hilbert, G., Richard, T., Sánchez-Díaz, M., Delrot, S., Aguirreolea, J., Pascual, I., Gomès, E.** 2014. Ultraviolet-B radiation modifies the quantitative and qualitative profile of flavonoids and amino acids in grape berries. *Phytochemistry*, **102**, 106-114.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Müller, B., Schulz, B.** 2002. Multifunctionality of plant ABC transporters—more than just detoxifiers. *Planta*, **214**, 345-355.
- Matas, A.J., Cuartero, J., Heredia, A.** 2004. Phase transitions in the biopolyester cutin isolated from tomato fruit cuticles. *Thermochimica Acta*, **409**, 165-168.
- Matas, A.J., López-Casado, G., Cuartero, J., Heredia, A.** 2005. Relative humidity and temperature modify the mechanical properties of isolated tomato fruit cuticles. *American Journal of Botany*, **92**, 462-468.
- Matas, A.J., Agustí, J., Tadeo, F.R., Talón, M., Rose, J.K.C.** 2010. Tissue-specific transcriptome profiling of the citrus fruit epidermis and subepidermis using laser capture microdissection. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 3321-3330.
- Matas, A.J., Yeats, T.H., Buda, G.J., Zheng, Y., Chatterjee, S., Tohge, T., Ponnala, L., Adato, A., Aharoni, A., Stark, R., Fernie, A.R., Fei, Z., Giovannoni, J.J., Rose, J.K.**

2011. Tissue- and cell-type specific transcriptome profiling of expanding tomato fruit provides insights into metabolic and regulatory specialization and cuticle formation. *The Plant Cell*, **23**, 3893-3910.
- Matsuda, J., Okabe, S., Hashimoto, T., Yamada, Y.** 1991. Molecular cloning of hyoscyamine 6 beta-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 9460-9464.
- McGlasson W.B., Wade D.L., Idato I.** 1978. Phytohormones and fruit ripening. En: Letham, D.S., Goodwin, P.B., Higgins, T.J.V. (eds). *Phytohormones and Related Compounds – A Comprehensive Treatise*. Elsevier, Amsterdam, 447–494.
- Martens, S., Preuss, A., Matern, U.** 2010. Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. *Phytochemistry*, **71**, 1040-1049.
- Mathews, H., Clendennen, S.K., Caldwell, C.G., Liu, X.L., Connors, K., Matheis, N., Schuster, D.K., Menasco, D.J., Wagoner, W., Lightner, J., Wagner, D.R.** 2003. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *The Plant Cell*, **15**, 1689-1703.
- Mathieu-Rivet, E., Gevaudant, F., Sicard, A., Salar, S., Do, P.T., Mouras, A., Fernie, A.R., Gibon, Y., Rothan, C., Chevalier, C., Hernould, M.** 2010. Functional analysis of the anaphase promoting complex activator CCS52A highlights the crucial role of endoreduplication for fruit growth in tomato. *The Plant Journal*, **62**, 727-741.
- Matson, P.A., Parton, W.J., Power, A.G., Swift, M.J.** 1997. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science*, **277**, 504-509.
- Medici, A., Krouk, G.** 2014: The primary nitrate response: a multifaceted signaling pathway. *Journal of Experimental Botany*, **65**, 5567-5576.
- Meléndez-Martínez, A.J., Fraser, P.D., Bramley, P.M.** 2010. Accumulation of health promoting phytochemicals in wild relatives of tomato and their contribution to in vitro antioxidant activity. *Phytochemistry*, **71**, 1104-1114.
- Mehrtens, F., Kranz, H., Bednarek, P., Weisshaar, B.** 2005. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiology*, **138**, 1083-1096.
- Merkle, T., Frohnmeier, H., Schulze-Lefert, P., Dangel, J.L., Hahlbrock, K., Schäfer, E.** 1994. Analysis of the parsley chalcone-synthase promoter in response to different light qualities. *Planta*, **193**, 275-282.
- Mierziak, J., Kostyn, K., Kulma, A.** 2014. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, **19**, 16240-16265.



- Millar, A.A., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, E.M., Taylor, D.C., Kunst, L. 1999. *CUT1*, an *Arabidopsis* gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *The Plant Cell*, **11**, 825-838.
- Miller, P. 1754. *The Gardener's Dictionary*. 4ª edición. Rivington, J., Rivington, J. (eds). Londres.
- Miller, A.J., Cramer, M.D. 2004. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil*, **274**, 1-36.
- Mintz-Oron, S., Mandel, T., Rogachev, I., Feldberg, L., Lotan, O., Yativ, M., Wang, Z., Jetter, R., Venger, I., Adato, A., Aharoni, A. 2008. Gene expression and metabolism in tomato fruit surface tissues. *Plant Physiology*, **147**, 823-851.
- Misson, J., Ragothama, K.G., Jain, A., Jouhet, J., Block, M.A., Bligny, R., Ortet, P., Creff, A., Somerville, S., Rolland, N., Doumas, P., Nacry, P., Herrerra-Estrella, L., Nussaume, L., Thibaud, M.C. 2005. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 11934-11939.
- Mizuno, H., Yazawa, T., Kasuga, S., Sawada, Y., Ogata, J., Ando, T., Kanamori, H., Yonemaru, J., Wu, J., Hirai, M.Y., Matsumoto, T., Kawahigashi, H. 2014. Expression level of a *flavonoid 3'-hydroxylase* gene determines pathogen-induced color variation in sorghum. *BMC Research Notes*, **7**, 761.
- Mizuuchi, Y., Shimokawa, Y., Wanibuchi, K., Noguchi, H., Abe, I. 2008. Structure function analysis of novel type III polyketide synthases from *Arabidopsis thaliana*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **31**, 2205-10.
- Mo, Y., Nagel, C., Taylor, L.P. 1992. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 7213-7217.
- Moco, S., Bino, R.J., Vorst, O., Verhoeven, H.A., de Groot, J., van Beek, T.A., Vervoort, J., de Vos, R.C. 2006. A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiology*, **141**, 1205-1218.
- Mol, J., Grotewold, E., Koes, R. 1998. How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science*, **3**, 212-217.
- Molina, I., Kosma, D. 2015. Role of HXXXD-motif/BAHD acyltransferases in the biosynthesis of extracellular lipids. *Plant Cell Reports*, **34**, 587-601.
- Molina, I., Ohlrogge, J.B., Pollard, M. 2008. Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **53**, 437-449.

- Morcuende, R., Bari, R., Gibon, Y., Zheng, W., Pant, B.D., Bläsing, O., Usadel, B., Czechowski, T., Udvardi, M.K., Stitt, M., Scheible, W.R.** 2007. Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant, Cell & Environment*, **30**, 85-112.
- Morita, Y., Takagi, K., Fukuchi-Mizutani, M., Ishiguro, K., Tanaka, Y., Nitasaka, E., Nakayama, M., Saito, N., Kagami, T., Hoshino, A., Iida, S.** 2014. A chalcone isomerase-like protein enhances flavonoid production and flower pigmentation. *The Plant Journal*, **78**, 294-304.
- Mou, W., Li, D., Luo, Z., Mao, L., Ying, T.** 2015. Transcriptomic analysis reveals possible influences of ABA on secondary metabolism of pigments, flavonoids and antioxidants in tomato fruit during ripening. *PLoS ONE*, **10**, e0129598.
- Mouradov, A., Spangenberg, G.** 2014. Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Frontiers in Plant Science*, **5**, 620.
- Muir, S.R., Collins, G.J., Robinson, S., Hughes, S., Bovy, A., de Vos, R.C., van Tunen, A.J., Verhoeyen, M.E.** 2001. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nature Biotechnology*, **19**, 470-474.
- Murphy, A., Peer, W.A., Taiz, L.** 2000. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta*, **211**, 315-324.
- Nadakuduti, S.S., Pollard, M., Kosma, D.K., Allen, C., Ohlrogge, J.B., Barry, C.S.** 2012. Pleiotropic phenotypes of the sticky peelmutant provide new insight into the role of *CUTIN DEFICIENT2* in epidermal cell function in tomato. *Plant Physiology*, **159**, 945-960.
- Nagaoka, T., Yoshihara, T., Ohra, J., Sakamura, S.** 1993. Steroidal alkaloids from roots of tomato stock. *Phytochemistry*, **34**, 1153-1157.
- Naranjo, M.A., Forment, J., Roldán, M., Serrano, R., Vicente, O.** 2006. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* LTL1, a salt-induced gene encoding a GDSL-motif lipase, increases salt tolerance in yeast and transgenic plants. *Plant, Cell & Environment*, **29**, 1890-1900.
- Näsholm, T., Kielland, K., Ganeteg, U.** 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist*, **182**, 31-48.
- Nawrath, C., Schreiber, L., Franke, R.B., Geldner, N., Reina-Pinto, J.J., Kunst, L.** 2013. Apoplastic diffusion barriers in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*, **11**, e0167.
- Nemie-Feyissa, D., Olafsdottir, S.M., Heidari, B., Lillo, C.** 2014. Nitrogen depletion and small R3-MYB transcription factors affecting anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* leaves. *Phytochemistry*, **98**, 34-40.

- Nesbitt, T.C., Tanksley, S.D. 2002. Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*: implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. *Genetics*, **162**, 365-379.
- Ngaki, M.N., Louie, G.V., Philippe, R.N., Manning, G., Pojer, F., Bowman, M.E., Li, L., Larsen, E., Wurtele, E.S., Noel, J.P. 2012. Evolution of the chalcone-isomerase fold from fatty-acid binding to stereospecific catalysis. *Nature*, **485**, 530-533.
- Nicholson, J.W. 1997. *The chemistry of polymers*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Niklas, K.J. 1992. *Plant biomechanics: an engineering approach to plant form and function*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Niklas, K.J. 2013. Biophysical and size-dependent perspectives on plant evolution. *Journal of Experimental Botany*, **64**, 4817-4817.
- Nip, M., Tegelaar, E.W., Brinkhuis, H., de Leeuw, J.W., Schenck, P.A., Holloway, P.J. 1986a. Analysis of modern and fossil plant cuticles by Curie point Py-GC and Curie point Py-GC-MS: recognition of a new, highly aliphatic and resistant biopolymer. *Organic Geochemistry*, **10**, 769-778.
- Nip, M., Tegelaar, E.W., de Leeuw, J.W., Schenck, P.A., Holloway, P.J. 1986b. A new non-saponifiable highly aliphatic and resistant biopolymer in plant cuticles. Evidence from pyrolysis and <sup>13</sup>C-NMR analysis of present-day and fossil plants. *Naturwissenschaften*, **73**, 579-585.
- Nobusawa, T., Okushima, Y., Nagata, N., Kojima, M., Sakakibara, H., Umeda, M. 2013. Synthesis of very-long-chain fatty acids in the epidermis controls plant organ growth by restricting cell proliferation. *PLoS Biology*, **11**, e1001531.
- Oh, I.S., Park, A.R., Bae, M.S., Kwon, S.J., Kim, Y.S., Lee, J.E., Kang, N.Y., Lee, S., Cheong, H., Park, O.K. 2005. Secretome analysis reveals an Arabidopsis lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *The Plant Cell*, **17**, 2832-2847.
- Ohta, K., Ito, N., Hosoki, T., Sugi, Y. 1991. Influence of relative humidity on fruit cracking of cherry tomato [*Lycopersicon*] grown on hydroponic culture and its control. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **60**, 337-343.
- Olsen, K.M., Slimestad, R., Lea, U.S., Brede, C., Løvdaal, T., Ruoff, P., Verheul, M., Lillo, C. 2009. Temperature and nitrogen effects on regulators and products of the flavonoid pathway: experimental and kinetic model studies. *Plant, Cell & Environment*, **32**, 286-299.
- O'Neill, S.D., Tong, Y., Spörlein, B., Forkmann, G., Yoder, J.I. 1990. Molecular genetic analysis of chalcone synthase in *Lycopersicon esculentum* and an anthocyanin-deficient mutant. *Molecular & General Genetics*, **224**, 279-288.

- Onyilagha, J.C., Grotewold, E.** 2004. The biology and structural distribution of surface flavonoids. *Recent Research Developments in Plant Science*, **2**, 53-71.
- Opara, L.U., Studman, C.J., Banks, N.H.** 1997. Sunlight affects the incidence of internal ring cracking and other physical attributes of 'Gala' apples. *Journal of Tree Fruit Production*, **2**, 45-52.
- Orgell, W.H.** 1955. The isolation of plant cuticle with pectin enzymes. *Plant Physiology*, **30**, 78-80.
- Oshima, Y., Shikata, M., Koyama, T., Ohtsubo, N., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M.** 2013. MIXTA-like transcription factors and *WAX INDUCER1/SHINE1* coordinately regulate cuticle development in *Arabidopsis* and *Torenia fournieri*. *The Plant Cell*, **25**, 1609-1624.
- Owens, D.K., Alerding, A.B., Crosby, K.C., Bandara, A.B., Westwood, J.H., Winkel, B.S.** 2008. Functional analysis of a predicted flavonol synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **147**, 1046-1061.
- Page, R.D.** 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, **12**, 357-358.
- Pandey, A., Misra, P., Choudhary, D., Yadav, R., Goel, R., Bhambhani, S., Sanyal, I., Trivedi, R., Trivedi, P.K.** 2015. *AtMYB12* expression in tomato leads to large scale differential modulation in transcriptome and flavonoid content in leaf and fruit tissues. *Scientific Reports*, **5**, 12412.
- Panikashvili, D., Savaldi-Goldstein, S., Mandel, T., Yifhar, T., Franke, R.B., Höfer, R., Schreiber, L., Chory, J., Aharoni, A.** 2007. The *Arabidopsis* *DESPERADO/AtWBC11* transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiology*, **145**, 1345-1360.
- Panikashvili, D., Shi, J.X., Schreiber, L., Aharoni, A.** 2009. The *Arabidopsis* *DCR* encoding a soluble BAHD acyltransferase is required for cutin polyester formation and seed hydration properties. *Plant Physiology*, **151**, 1773-1789.
- Parisi, M., Giordano, I., Pentangelo, A., D'Onofrio, B., Villari, G.** 2006. Effects of different levels of nitrogen fertilisation on yield and fruit quality in processing tomato. *Acta Horticulturae*, **700**, 129-132.
- Peer, W.A., Murphy, A.S.** 2006. Flavonoids as signal molecules. En Grotewold, E. (ed), *The science of flavonoids*. Springer, Nueva York, 239-268.
- Peer, W.A., Murphy, A.S.** 2007. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends in Plant Science*, **12**, 556-563.
- Peet, M.** 1992. Fruit cracking in tomato. *HortTechnology*, **2**, 216-223.
- Peet, M.M., Willits, D.H.** 1995. Role of excess water in tomato fruit cracking. *HortScience*, **30**, 65-68.

- Peet, M., Welles, G.** 2005. Greenhouse tomato production. En: Heuvelink, E. (ed). *Tomatoes*. CABI Publishing, Wallingford, U.K., 257-304.
- Pelletier, M.K., Murrell, J.R., Shirley, B.W.** 1997. Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **11**, 1437-1445.
- Peng, M., Hudson, D., Schofield, A., Tsao, R., Yang, R., Gu, H., Bi, Y.M., Rothstein, S.J.** 2008. Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the *NLA* gene. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 2933-2944.
- Peralta, I.E., Spooner, D.** 2000. Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana*, **28**, 45-54.
- Peralta, I.E., Knapp, S., Spooner, D.M.** 2005. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*, **30**, 424-434.
- Peralta, I P., Spooner, D.M., Knapp, S.** 2008. Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*: Solanaceae). *Systematic Botany Monographs*, **84**, 1-186.
- Peralta, I.E., Spooner, D.M.** 2005. Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*Solanum* L. Section *Lycopersicon*). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, **104**, 227-257.
- Peralta, I.E., Spooner, D.M.** 2006. History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). En: Razdan, M.K., Mattoo, A.K. (eds). *Tomato*. CRC Press FL. *Genetic Improvement of Solanaceous Crops*, **2**, 1-24.
- Peralta, I.E., Knapp, S., Spooner, D.M.** 2006. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Tomato Genetics Cooperative Report*, **56**, 6-12.
- Pérez-Díaz, J.R., Pérez-Díaz, J., Madrid-Espinoza, J., González-Villanueva, E., Moreno, Y., Ruiz-Lara, S.** 2016. New member of the R2R3-MYB transcription factors family in grapevine suppresses the anthocyanin accumulation in the flowers of transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology*, **90**, 63-76.
- Petracek, P.D., Bukovac, M.J.** 1995. Rheological properties of enzymatically isolated tomato fruit cuticle. *Plant Physiology*, **109**, 675-679.
- Petry, N.** 2014. Polyphenols and low iron bioavailability. En: Watson, R.R., Preedy, V.R., Zibadi S. (eds). *Polyphenols in human health and disease*. Academic Press, London, 311-322.
- Pfaffl, M.W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**, e45.

- Pfündel, E.E., Agati, G., Cerovic, Z.C.** 2006. Optical properties of plant cuticles. En: Riederer, M., Müller, C. (eds). *Biology of the plant cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, 216-249.
- Philippe, G., Gaillard, C., Petit, J., Geneix, N., Dalgalarrodo, M., Bres, C., Mauxion, J.P., Franke, R., Rothan, C., Schreiber, L., Marion, D., Bakan, B.** 2016. Ester cross-link profiling of the cutin polymer of wild-type and cutin synthase tomato mutants highlights different mechanisms of polymerization. *Plant Physiology*, **170**, 807-820.
- Pill, W., Lambeth, V., Hinckley, T.** 1978. Effects of nitrogen form and level on ion concentrations, water stress, and blossom-end rot incidence in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **103**, 265-268.
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., Ohlrogge, J.B.** 2008. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science*, **13**, 236-246.
- Povero, G., Gonzali, S., Bassolino, L., Mazzucato, A., Perata, P.** 2011. Transcriptional analysis in high-anthocyanin tomatoes reveals synergistic effect of *Aft* and *atv* genes. *Journal of Plant Physiology*, **168**, 270-279.
- Prescott, A.G., John, P.** 1996. Dioxygenases: molecular structure and role in plant metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**, 245-271.
- Pretty, J.** 2008. Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences*, **363**, 447-465.
- Qin, Y.M., Hu, C.Y., Pang, Y., Kastaniotis, A.J., Kalervo Hiltunen, J., Zhu, Y.Z.** 2007. Saturated very-long-chain fatty acids promote cotton fiber and Arabidopsis cell elongation by activating ethylene biosynthesis. *The Plant Cell*, **19**, 3692-3704.
- Raffo, A., La Malfa, G., Fogliano, V., Maiani, G., Quaglia, G.** 2006. Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 11-19.
- Raffaele, S., Leger, A., Roby, D.** 2009. Very long chain fatty acid and lipid signaling in the response of plants to pathogens. *Plant Signaling & Behavior*, **4**, 94-99.
- Raffaele, S., Vaillau, F., Léger, A., Joubès, J., Miersch, O., Huard, C., Blée, E., Mongrand, S., Domergue, F., Roby, D.** 2008. A MYB transcription factor regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **20**, 752-767.
- Rahimi, S., Hasanloo, T., Najafi, F., Ali, R., Khavari-Nejad, R.A.** 2011. Enhancement of silymarin accumulation using precursor feeding in *Silybum marianum* hairy root cultures. *Plant Omics Journal*, **4**, 34-39.

- Ralston, L., Subramanian, S., Matsuno, M., Yu, O.** 2005. Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases. *Plant Physiology*, **137**, 1375-1388.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H., Moorman, A.F.** 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, **339**, 62-66.
- Rasmussen, R.** 2001. Quantification on the LightCycler. En: Meuer, S., Wittwer, C., Nakagawara, K. (eds). *Rapid cycle real-time PCR: Methods and Applications*. Springer-Verlag, Heidelberg, 21-34.
- Rayle, D.L., Cleland, R.E.** 1992. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, **99**, 1271-1274.
- Reina, J.J., Domínguez, E., Heredia, A.** 2001. Water sorption-desorption in conifer cuticles: the role of lignin. *Physiologia Plantarum*, **112**, 372-378.
- Reina, J.J., Guerrero, C., Heredia, A.** 2007. Isolation, characterization, and localization of *AgaSGNH* cDNA: a new SGNH-motif plant hydrolase specific to *Agave americana* L. leaf epidermis. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 2717-2731.
- Reina-Pinto, J.J., Yephremov, A.** 2009. Lipid determinants of cell death. *Plant Signaling & Behavior*, **4**, 625-628.
- Remans, T., Keunen, E., Bex, G.J., Smeets, K., Vangronsveld, J., Cuypers, A.** 2014. Reliable gene expression analysis by reverse transcription-quantitative PCR: reporting and minimizing the uncertainty in data accuracy. *The Plant Cell*, **26**, 3829-3837.
- Ren, M., Venglat, P., Qiu, S., Feng, L., Cao, Y., Wang, E., Xiang, D., Wang, J., Alexander, D., Chalivendra, S., Logan, D., Mattoo, A., Selvaraj, G., Datla, R.** 2012. Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **24**, 4850-4874.
- Rick, C.M., Fobes, F.** 1975. Allozyme variation in the cultivated tomato and closely related species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, **102**, 376-384.
- Riederer, M.** 2006a. Introduction: biology of the plant cuticle. En: Riederer, M., Müller, C. (eds). *Biology of the plant cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, 1-10.
- Riederer, M.** 2006b. Thermodynamics of the water permeability of plant cuticles: characterization of the polar pathway. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 2937-2942.
- Riederer, M., Schreiber, L.** 2001. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 2023-2032.
- Ringli, C., Bigler, L., Kuhn, B.M., Leiber, R.M., Diet, A., Santelia, D., Frey, B., Pollmann, S., Klein, M.** 2008. The modified flavonol glycosylation profile in the

- Arabidopsis roll* mutant results in alterations in plant growth and cell shape formation. *The Plant Cell*, **20**, 1470-1481.
- Robertson, G.P., Vitousek, P.M.** 2009. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. *Annual Review of Environmental Resources*, **34**, 97-125.
- Rotenberg, D., Thompson, T.S., German, T.L., Willis, D.K.** 2006. Methods for effective real-time RT-PCR analysis of virus-induced gene silencing. *Journal of Virological Methods*, **138**, 49-59.
- Roudier, F., Gissot, L., Beaudoin, F., Haslam, R., Michaelson, L., Marion, J., Molino, D., Lima, A., Bach, L., Morin, H., Tellier, F., Palauqui, J.C., Bellec, Y., Renne, C., Miquel, M., Dacosta, M., Vignard, J., Rochat, C., Markham, J.E., Moreau, P., Napier, J., Faure, J.D.** 2010. Very-long-chain fatty acids are involved in polar auxin transport and developmental patterning in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **22**, 364-375.
- Ruijter, J., Ramakers, C., Hoogaars, W., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M., Moorman, A.** 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, **37**, e45.
- Ryder, T.B., Hedrick, S.A., Bell, J.N., Liang, X., Clouse, S.D., Lamb, C.J.** 1987. Organization and differential activation of a gene family encoding the plant defense enzyme chalcone synthase in *Phaseolus vulgaris*. *Molecular and General Genetics*, **210**, 219-233.
- Saladié, M., Matas, A.J., Isaacson, T., Jenks, M.A., Goodwin, S.M., Niklas, K.J., Xiaolin, R., Labavitch, J.M., Shackel, K.A., Fernie, A.R., Lytovchenko, A., O'Neill, M.A., Watkins, C.B., Rose, J.K.C.** 2007. A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiology*, **144**, 1012-1028.
- San-Bento, R., Farcot, E., Galletti, R., Creff, A., Ingram, G.** 2014. Epidermal identity is maintained by cell-cell communication via a universally active feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **77**, 46-58.
- Sankaranarayanan R, Saxena P, Marathe UB, Gokhale RS, Shanmugam VM, Rukmini R.** 2004. A novel tunnel in mycobacterial type III polyketide synthase reveals the structural basis for generating diverse metabolites. *Nature Structural & Molecular Biology*, **11**, 894-900.
- Savaldi-Goldstein, S., Peto, C., Chory, J.** 2007. The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. *Nature*, **446**, 199-202.
- Saxena, P., Yadav, G., Mohanty, D., Gokhale, R.S.** 2003. A new family of type III polyketide synthases in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 44780-44790.
- Scheible, W.R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M.K., Stitt, M.** 2004. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth



- processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiology*, **136**, 2483-2499.
- Schijlen, E., de Vos, R.C., Jonker, H., van den Broeck, H., Molthoff, J., van Tunen, A., Martens, S., Bovy, A.** 2006. Pathway engineering for healthy phytochemicals leading to the production of novel flavonoids in tomato fruit. *Plant Biotechnology Journal*, **4**, 433-444.
- Schijlen, E., de Vos, R.C., Martens, S., Jonker, H.H., Rosin, F.M., Molthoff, J.W., Tikunov, Y.M., Angement, G.C., van Tunen, A.J., Bovy, A.G.** 2007. RNA interference silencing of chalcone synthase, the first step in the flavonoid biosynthesis pathway, leads to parthenocarpic tomato fruits. *Plant Physiology*, **144**, 1520-1530.
- Scholberg, J., McNeal, B.L., Boote, K.J., Jones, J.W., Locascio, S.J., Olson, S.M.** 2000. Nitrogen stress effects on growth and nitrogen accumulation by field-grown tomato. *Agronomy Journal*, **92**, 159-167.
- Schönherr, J., Lenzian, K.J.** 1981. A simple and inexpensive method of measuring water permeability of isolated plant cuticular membranes. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **102**, 321-327.
- Schönherr, J., Eckl, K., Gruler, H.** 1979. Water permeability of plant cuticles: the effect of temperature on diffusion of water. *Planta*, **147**, 21-26.
- Schreiber, L.** 2010. Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in Plant Science*, **15**, 546-553.
- Schreiber, L., Schönherr, J.** 1990. Phase transitions and thermal expansion coefficients of plant cuticles. The effects of temperature on structure and function. *Planta*, **182**, 186-193.
- Schreiber, L., Schönherr, J.** 2009. *Water and solute permeability of plant cuticles*. Springer, Heidelberg.
- Schulze-Lefert, P., Becker-André, M., Schulz, W., Hahlbrock, K., Dangl, J.L.** 1989a. Functional architecture of the light-responsive chalcone synthase promoter from parsley. *The Plant Cell*, **1**, 707-714.
- Schulze-Lefert, P., Dangl, J.L., Becker-André, M., Hahlbrock, K., Schulz, W.** 1989b. Inducible in vivo DNA footprints define sequences necessary for UV light activation of the parsley chalcone synthase gene. *The EMBO Journal*, **8**, 651-656.
- Segado, P., Domínguez, E., Heredia, A.** 2016. Ultrastructure of the epidermal cell wall and cuticle of tomato fruit (*Solanum lycopersicum* L.) during development. *Plant Physiology*, **170**, 935-946.
- Seo, P.J., Lee, S.B., Suh, M.C., Park, M.J., Go, Y.S., Park, C.M.** 2011. The *MYB96* transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **23**, 1138-1152.

- Seo, P.J., Xiang, F., Qiao, M., Park, J.Y., Lee, Y.N., Kim, S.G., Lee, Y.H., Park, W.J., Park, C.M. 2009. The *MYB96* transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **151**, 275-289.
- Seymour, G.B., Manning, K., Eriksson, E.M., Popovich, A.H., King, G.J. 2002. Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 2065-2071.
- Seymour, G.B., Østergaard, L., Chapman, N.H., Knapp, S., Martin, C. 2013. Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology*, **64**, 219-241.
- Shi, J.X., Adato, A., Alkan, N., He, Y., Lashbrooke, J., Matas, A.J., Meir, S., Malitsky, S., Isaacson, T., Prusky, D., Leshkowitz, D., Schreiber, L., Granell, A.R., Widemann, E., Grausem, B., Pinot, F., Rose, J.K., Rogachev, I., Rothan, C., Aharoni, A. 2013. The tomato *SISHINE3* transcription factor regulates fruit cuticle formation and epidermal patterning. *New Phytologist*, **197**, 468-480.
- Shi, J.X., Malitsky, S., de Oliveira, S., Branigan, C., Franke, R.B., Schreiber, L., Aharoni, A. 2011. SHINE transcription factors act redundantly to pattern the archetypal surface of *Arabidopsis* flower organs. *PLoS Genetics*, **7**, e1001388.
- Shi, S.P., Wanibuchi, K., Morita, H., Endo, K., Noguchi, H., Abe, I. 2009. Enzymatic formation of unnatural novel chalcone, stilbene, and benzophenone scaffolds by plant type III polyketide synthase. *Organic Letters*, **11**, 551-554.
- Shimada, N., Aoki, T., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Ayabe, S. 2003. A cluster of genes encodes the two types of chalcone isomerase involved in the biosynthesis of general flavonoids and legume-specific 5-deoxy(iso)flavonoids in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, **131**, 941-951.
- Silva-Beltrán, N.P., Ruiz-Cruz, S., Cira-Chávez, L.A., Estrada-Alvarado, M.I., Ornelas-Paz, J.J., López-Mata, M.A., Del-Toro-Sánchez, C.L., Ayala-Zavala, J.F., Márquez-Ríos, E. 2015. Total phenolic, flavonoid, tomatine, and tomatidine contents and antioxidant and antimicrobial activities of extracts of tomato plant. *International Journal of Analytical Chemistry*, **2015**, 284071.
- Simonne, A., Fuzeré, J., Simonne, E., Hochmuth, R., Marshall, M. 2007. Effects of nitrogen rates on chemical composition of yellow grape tomato grown in a subtropical climate. *Journal of Plant Nutrition*, **30**, 927-935.
- Smith, H., Attridge, T.H. 1970. Increased PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE activity due to light treatment and its significance for the mode of action of phytochrome. *Phytochemistry*, **9**, 487-495.
- Smith, H., Harper, D.B. 1970. The effects of short- and long-term irradiation on the flavonoid complement of the terminal buds of *Pisum sativum* var. *Alaska*. *Phytochemistry*, **9**, 477-485.

- Slimestad, R., Verheul, M.** 2009. Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**, 1255-1270.
- Slimestad, R., Verheul, M.J.** 2005a. Content of chalconaringenin and chlorogenic acid in cherry tomatoes is strongly reduced during postharvest ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 7251-7256.
- Slimestad, R., Verheul, M.J.** 2005b. Seasonal variations in the level of plant constituents in greenhouse production of cherry tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 3114-3119.
- Slimestad, R., Verheul, M.** 2009. Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**, 1255-1270.
- Soubeyrand, E., Basteau, C., Hilbert, G., van Leeuwen, C., Delrot, S., Gomès, E.** 2014. Nitrogen supply affects anthocyanin biosynthetic and regulatory genes in grapevine cv. Cabernet-Sauvignon berries. *Phytochemistry*, **103**, 38-49.
- Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G., Tonelli, C.** 1994. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology*, **24**, 743-755.
- Spooner, D.M., Peralta, I.E., Knapp, S.** 2005. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. *Taxon*, **54**, 43-61.
- SPSS.** 2014. IBM SPSS Statistics for Windows, version 23.0. IBM Corp, Armonk, NY.
- Stark, R.E., Yan, B., Stanley-Fernández, S.M., Chen, Z.J., Garbow, J.R.** 2008. NMR characterization of hydration and thermal stress in tomato fruit cuticles. *Phytochemistry*, **69**, 2689-2695.
- Stewart, A., Chapman, W., Jenkins, G., Graham, I., Martin, T., Crozier, A.** 2001. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant, Cell & Environment*, **24**, 1189-1197.
- Stitt M., Krapp, A.** 1999. The molecular physiological basis for the interaction between elevated carbon dioxide and nutrients. *Plant, Cell & Environment*, **22**, 583-622.
- Stotz, G., Forkmann, G.** 1981. Oxidation of flavanones to flavones with flower extracts of *Antirrhinum majus* (snapdragon). *Zeitschrift für Naturforschung C*, **36**, 737-741.
- Stout, M.J., Brovont, R.A., Duffey, S.S.** 1998. Effect of nitrogen availability on expression of constitutive and inducible chemical defenses in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Chemical Ecology*, **24**, 945-963.

- Sun, L., Sun, Y., Zhang, M., Wang, L., Ren, J., Cui, M., Wang, Y., Ji, K., Li, P., Li, Q. 2012. Suppression of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, which encodes a key enzyme in abscisic acid biosynthesis, alters fruit texture in transgenic tomato. *Plant Physiology*, **158**, 283-298.
- Sutter, A., Poulton, J., Grisebach, H. 1975. Oxidation of flavanone to flavone with cell-free extracts from young parsley leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **170**, 547-556.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Sylvester-Bradley, R., Kindred, D.R. 2009. Analysing nitrogen responses of cereals to prioritize routes to the improvement of nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 1939-1951.
- Takada, S. 2013. Post-embryonic induction of *ATML1-SRDX* alters the morphology of seedlings. *PLoS ONE*, **25**: e79312.
- Takada, S., Iida, H. 2014. Specification of epidermal cell fate in plant shoots. *Frontiers in Plant Science*, **5**, 49.
- Takahashi, Y., Tsubaki, S., Sakamoto, M., Watanabe, S., Azuma, J.I. 2012. Growth-dependent chemical and mechanical properties of cuticular membranes from leaves of *Sonneratia alba*. *Plant, Cell & Environment*, **35**, 1201-1210.
- Tan, S. 1980. Phenylalanine ammonia-lyase and the phenylalanine ammonia-lyase inactivating system: effects of light, temperature and mineral deficiencies. *Australian Journal of Plant Physiology*, **7**, 159-167.
- Tanaka, H., Machida, Y. 2006. The cuticle and cellular interactions. En: Riederer, M., Müller, C. (eds). *Biology of the plant cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, 312-333.
- Tandon, K.S., Abegaz, E., Shewfelt, R.L., Baldwin, E.A., Scott, J.W. 2000. Interrelationship of sensory descriptors and chemical composition as affected by harvest maturity and season on fresh tomato flavor. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society. Florida State Horticultural Society*, **113**, 289-294.
- Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D., Agati G. 2004. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist*, **163**, 547-561.
- Tattini, M., Guidi, L., Morassi-Bonzi, L., Pinelli, P., Remorini, D., Degl'innocenti, E., Giordano, C., Massai, R., Agati, G. 2005. On the role of flavonoids in the integrated mechanisms of response of *Ligustrum vulgare* and *Phillyrea latifolia* to high solar radiation. *New Phytologist*, **167**, 457-470.

- Taylor, L.P., Grotewold, E.** 2005. Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 317-323.
- Thiagu, R., Chand, N., Ramana, K.** 1993. Evolution of mechanical characteristics of tomatoes of two varieties during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **62**, 175-183.
- Tian, Q., Chen, F., Liu, J., Zhang, F., Mi, G.** 2008. Inhibition of maize root growth by high nitrate supply is correlated with reduced IAA levels in roots. *Journal of Plant Physiology*, **165**, 942-951.
- Tigchelaar, E.C., McGlasson, W.B., Buescher, R.W.** 1978. Genetic regulation of tomato fruit ripening. *HortScience*, **13**, 508-513.
- Todd, J., Post-Beittenmiller, D., Jaworski, J.G.** 1999. KCS1 encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **17**, 119-130.
- The Tomato Genome Consortium.** 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, **485**, 635-641.
- Tournefort, J.P.** 1694. *Elémens de Botanique, ou méthode pour connaître les plantes*. Imprimerie Royale, París.
- Tropf, S., Kärcher, B., Schröder, G., Schröder, J.** 1995. Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthase (stilbenes and chalcone synthase). A single active site for the condensing reaction is sufficient for synthesis of stilbenes, chalcones, and 6'-deoxychalcones. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 7922-7928.
- Tsubaki, S., Ozaki, Y., Yonemori, K., Azuma, J.I.** 2012. Mechanical properties of fruit-cuticular membranes isolated from 27 cultivars of *Diospyros kaki* Thunb. *Food Chemistry*, **132**, 2135-2139.
- Tsubaki, S., Sugimura, K., Teramoto, Y., Yonemori, K., Azuma, J.I.** 2013. Cuticular membrane of *Fuyu persimmon* fruit is strengthened by triterpenoid nano-fillers. *PLoS ONE*, **8**, e75275.
- Tsuwamoto, R., Fukuoka, H., Takahata, Y.** 2008. *GASSHO1* and *GASSHO2* encoding a putative leucine-rich repeat transmembrane-type receptor kinase are essential for the normal development of the epidermal surface in *Arabidopsis* embryos. *Plant Journal*, **54**, 30-42.
- Tu, Y., Liu, F., Guo, D., Fan, L., Zhu, Z., Xue, Y., Gao, Y., Guo, M.** 2016. Molecular characterization of flavanone 3-hydroxylase gene and flavonoid accumulation in two chemotyped safflower lines in response to methyl jasmonate stimulation. *BMC Plant Biology*, **16**, 132.

- Turnbull, J.J., Nakajima, J., Welford, R.W., Yamazaki, M., Saito, K., Schofield, C.J.** 2004. Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis: anthocyanidin synthase, flavonol synthase, and flavanone 3beta-hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 1206–1216.
- Ukitsu, H., Kuromori, T., Toyooka, K., Goto, Y., Matsuoka, K., Sakuradani, E., Shimizu, S., Kamiya, A., Imura, Y., Yuguchi, M., Wada, T., Hirayama, T., Shinozaki, K.** 2007. Cytological and biochemical analysis of COF1, an Arabidopsis mutant of an ABC transporter gene. *Plant and Cell Physiology*, **48**, 1524-1533.
- van Damme, M., Huibers, R.P., Elberse, J., van den Ackerveken, G.** 2008. Arabidopsis DMR6 encodes a putative 2OG-Fe(II) oxygenase that is defense-associated but required for susceptibility to downy mildew. *The Plant Journal*, **54**, 785–793.
- van der Meer, I.M., Spelt, C.E., Mol, J.N.M., Stuitje, A.R.** 1990. Promoter analysis of the chalcone synthase (chsA) gene of *Petunia hybrida*: a 67 bp promoter region directs flower-specific expression. *Plant Molecular Biology*, **15**, 95-109.
- van der Meer, I.M., Stam, M.E., van Tunen, A.J., Mol, J., Stuitje, A.R.** 1992. Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *The Plant Cell*, **4**, 253-262.
- van Tunen, A., Koes, R., Spelt, C., van der Krol, A., Stuitje, A., Mol, J.** 1988. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes. *The EMBO Journal*, **7**, 1257-1263.
- Vandesompele, J., de Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., van Roy, N., de Paepe, A., Speleman, F.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, **3**, research0034.
- Vimolmangkang, S., Han, Y., Wei, G., Korban, S.S.** 2013. An apple MYB transcription factor, *MdMYB3*, is involved in regulation of anthocyanin biosynthesis and flower development. *BMC Plant Biology*, **13**, 176.
- Villand, J., Skroch, P.W., Lai, T., Hanson, P., Kuo, C.G., Nienhuis, J.** 1998. Genetic Variation among tomato accessions from primary and secondary centers of diversity. *Crop Science*, **38**, 1339-1347.
- Villena, J.F., Domínguez, E., Stewart, D., Heredia, A.** 1999. Characterization and biosynthesis of non-degradable polymers in plant cuticles. *Planta*, **208**, 181-187.
- Vogg, G., Fischer, S., Leide, J., Emmanuel, E., Jetter, R., Levy, A.A., Riederer, M.** 2004. Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid  $\beta$ -ketoacyl-CoA synthase. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 1401-1410.

- von Mohl, H.** 1847. Untersuchenn die Frage: Bildet die Cellulose die Grundlage sämmtlicher vegetabilischen Membranen. *Botanisches Zeitung*, **5**, 497-505.
- Walle, T., Vincent, T.S., Walle, U.K.** 2003. Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells. *Biochemical Pharmacology*, **65**, 1603-1610.
- Wang, Y.T.; Huang, S.W.; Liu, R.L.; Jin, J.Y.** 2007. Effects of nitrogen application on flavor compounds of cherry tomato fruits. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **170**, 461-468.
- Wang, Z.Y., Xiong, L., Li, W., Zhu, J.K., Zhu, J.** 2011. The plant cuticle is required for osmotic stress regulation of abscisic acid biosynthesis and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **23**, 1971-1984.
- Warner, J.; Zhang, T.; Hao, X.** 2004. Effects of nitrogen fertilization on fruit yields and quality of processing tomatoes. *Canadian Journal of Plant Science*, **84**, 865-871.
- Wellmann, F., Lukacin, R., Moriguchi, T., Britsch, L., Schiltz, E., Matern, U.** 2002. Functional expression and mutational analysis of flavonol synthase from *Citrus unshiu*. *European Journal of Biochemistry*, **269**, 4134-4142.
- Weng, H., Molina, I., Shockey, J., Browse, J.** 2010. Organ fusion and defective cuticle function in a *lacs1 lacs2* double mutant of *Arabidopsis*. *Planta*, **231**, 1089-1100.
- Wiedemann, P., Neinhuis, C.** 1998. Biomechanics of isolated plant cuticles. *Botanica Acta*, **111**, 28-34.
- Williams, W., Cifuentes, S., del Aguila, V., Pérez, R.** 1992. Rejuvenation of a peach orchard in the highlands of Guatemala through integrated management. *Tropical Agriculture*, **69**, 341-346.
- Wilmouth, R.C., Turnbull, J.J., Welford, R.W., Clifton, I.J., Prescott, A.G., Schofield, C.J.** 2002. Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Structure*, **10**, 93-103.
- Wink, M.** 2010. Introduction. En: Wink, M. (ed). *Annual Plant Reviews vol. 39. Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*. Wiley-Blackwell, Oxford, 1-20.
- Wink, M., Botschen, F., Gosmann, C., Schäfer, H., Waterman, P.G.** 2010. Chemotaxonomy seen from a phylogenetic perspective and evolution of secondary metabolism. En: Wink, M. (ed). *Annual Plant Reviews vol. 39. Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*. Wiley-Blackwell, Oxford, 1-20.
- Winkel-Shirley, B.** 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 218-223.

- Winkel-Shirley, B.** 2001. Flavonoid biosynthesis. a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, **126**, 485-493.
- Winkel-Shirley, B.** 1999. Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum*, **107**, 142-149.
- Witcombe, J.R., Hollington, P.A., Howarth, C.J., Reader, S., Steele, K.A.** 2008. Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences*, **363**, 703-716.
- Wolf, L., Rizzini, L., Stracke, R., Ulm, R. Rensing, S.A.** 2010. The molecular and physiological responses of *Physcomitrella patens* to ultraviolet—B radiation. *Plant Physiology*, **153**, 1123–1134.
- Wolf, S., Hématy, K., Höfte, H.** 2012. Growth control and cell wall signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, **63**, 381-407.
- Wu, R., Li, S., He, S., Wassmann, F., Yu, C., Qin, G., Schreiber, L., Qu, L.J., Guet, H.** 2011. CFL1, a WW domain protein, regulates cuticle development by modulating the function of HDG1, a class IV homeodomain transcription factor, in rice and *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **23**, 3392-3411.
- Xia, Y., Yu, K., Navarre, D., Seebold, K., Kachroo, A., Kachroo, P.** 2010. The *glabral* mutation affects cuticle formation and plant responses to microbes. *Plant Physiology*, **154**, 833-846.
- Xiao, F.M., Goodwin, S.M., Xiao, Y., Sun, Z., Baker, D., Tang, X., Jenks, M.A., Zhouet, J.M.** 2004. *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *The Embo Journal*, **23**, 2903-2913.
- Xiong, Y., Sheen, J.** 2015. Novel links in the plant TOR kinase signaling network. *Current Opinion in Plant Biology*, **28**, 83-91.
- Yahara, S., Uda, N., Nohara, T.** 1996. Lycopersides A-C, three stereoisomeric 23-acetoxyspirosolan-3 $\beta$ -ol- $\beta$ -lycotetraosides from *Lycopersicon esculentum*. *Phytochemistry*, **42**, 169-172.
- Yamada, Y., Wittwer, S., Bukovac, M.** 1964. Penetration of ions through isolated cuticles. *Plant Physiology*, **39**, 28-32.
- Yang, J., Ordiz, M.I., Jaworski, J.G., Beachy, R.N.** 2011. Induced accumulation of cuticular waxes enhances drought tolerance in *Arabidopsis* by changes in development of stomata. *Plant Physiology and Biochemistry*, **49**, 1448-1455.
- Yang, S., Johnston, N., Talideh, E., Mitchell, S., Jeffree, C., Goodrich, J., Ingram, G.** 2008. The endosperm-specific ZHOUP1 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates endosperm breakdown and embryonic epidermal development. *Development*, **135**, 3501-3509.



- Yazaki, K.**, 2006. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Letters*, **580**, 1183-1191.
- Yeats, T.H., Howe, K.J., Matas, A.J., Buda, G.J., Thannhauser, T.W., Rose, J.K.** 2010. Mining the surface proteome of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit for proteins associated with cuticle biogenesis. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 3759-3771.
- Yeats, T.H., Huang, W., Chatterjee, S., Viart, H.M.F., Clausen, M.H., Stark, R.E., Rose, J.K.** 2014. Tomato Cutin Deficient 1 (CD1) and putative orthologs comprise an ancient family of cutin synthase-like (CUS) proteins that are conserved among land plants. *The Plant Journal*, **77**, 667-675.
- Yeats, T.H., Martin, L.B., Viart, H.M., Isaacson, T., He, Y., Zhao, L., Matas, A.J., Buda, G.J., Domozych, D.S., Clausen, M.H., Rose, J.K.** 2012. The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nature Chemical Biology*, **8**, 609-611.
- Mn Yephremov, A., Wisman, E., Huijser, P., Huijser, C., Wellesen, K., Saedler, H.** 1999. Characterization of the *FIDDLEHEAD* gene of *Arabidopsis* reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis. *The Plant Cell*, **11**, 2187-2201.
- Ylstra, B., Muskens, M., Van Tunen, A.J.** 1996. Flavonols are not essential for fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, **32**, 1155-1158.
- Yoder, J.I., Belzile, F., Tong, Y., Goldsbrough, A.** 1994. Visual markers for tomato derived from the anthocyanin biosynthetic pathway. *Euphytica*, **79**, 163-167.
- Young, H.** 1959. Inheritance of radial fruit cracking in a tomato cross. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, **72**, 207-210.
- Young, P.** 1947. Cuticle cracks in tomato fruits. *Phytopathology*, **37**, 143-145.
- Zeilmaker, T., Ludwig, N.R., Elberse, J., Seidl, M.F., Berke, L., Van Doorn, A., Schuurink, R.C., Snel, B., Van den Ackerveken, G.** 2015. DOWNY MILDEW RESISTANT 6 and DMR6-LIKE OXYGENASE 1 are partially redundant but distinct suppressors of immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **81**, 210-222.
- Zhang, J.Y., Broeckling, C.D., Blancaflor, E.B., Sledge, M.K., Sumner, L.W., Wang, Z.Y.** 2005. Overexpression of *WXPI*, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *The Plant Journal*, **42**, 689-707.
- Zhang, M., Leng, P., Zhang, G.L., Li, X.** 2009a. Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grapefruits. *Journal Plant Physiology*, **166**, 1241-1252.
- Zhang, M., Yuan, B., Leng, P.** 2009b. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 1579-1588.

- Zhang, Y., Yang, C., Li, Y., Zheng, N., Chen, H., Zhao, Q., Gao, T., Guo, H., Xie, Q. 2007. SDIR1 is a RING finger E3 ligase that positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **19**, 1912-1929.
- Zhang, Y., Butelli, E., De Stefano, R., Schoonbeek, H.J., Magusin, A., Pagliarani, C., Wellner, N., Hill, L., Orzáez, D., Granell, A., Jones, J.D.G., Martin, C. 2013. Anthocyanins double the shelf life of tomatoes by delaying over-ripening and reducing susceptibility to gray mold. *Current Biology*, **23**, 1094-1100.
- Zhang, Y., Butelli, E., Alseekh, S., Tohge, T., Rallapalli, G., Luo, J., Kwar, P.G., Hill, L., Santino, A., Fernie, A.R., Martin, C. 2015. Multi-level engineering facilitates the production of phenylpropanoid compounds in tomato. *Nature Communications*, **6**, 8635.
- Zhao, J. 2015. Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom. *Trends in Plant Science*, **20**, 576-585.
- Zhao, J., Dixon, R.A. 2010. The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport. *Trends in Plant Science*, **15**, 72-80.
- Zheng, H.Q., Rowland, O., Kunst, L. 2005. Disruptions of the *Arabidopsis* enoyl-CoA reductase gene reveal an essential role for very-long chain fatty acid synthesis in cell expansion during plant morphogenesis. *The Plant Cell*, **17**, 1467-1481.
- Zoratti, L., Karppinen, K., Luengo Escobar, A., Häggman, H., Jaakola, L. 2014. Light-controlled flavonoid biosynthesis in fruits. *Frontiers in Plant Science*, **5**, 534.
- Zornoza P., Esteban, R.M. 1984. Flavonoids content of tomato plants for the study of the nutritional status. *Plant and Soil*, **82**, 269-271.
- Zuluaga, A.P., Vega-Arreguín, J.C., Fei, Z., Matas, A.J., Patev, S., Fry, W.E., Rose, J.K. 2016. Analysis of the tomato leaf transcriptome during successive hemibiotrophic stages of a compatible interaction with the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology*, **17**, 42-54.

# ANEXOS

*"Ninguna ciencia, en cuanto a ciencia,  
engaña; el engaño está en quien lo sabe"*  
*Miguel de Cervantes*





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**Anexo I.** Secuencias de los cebadores usados para el análisis de expresión mediante qPCR de genes del metabolismo de flavonoides y de los genes de referencia. Se incluye el tamaño del amplicón generado por cada pareja en pares de bases (pb) y se muestra, siguiendo las directrices propuestas por Bustin *et al.* (2009) para experimentos de qPCR, la eficiencia de amplificación ( $E$ ) de los cebadores y su error asociado ( $SE E$ ), el coeficiente de determinación de la regresión lineal ( $R^2$ ) y coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) con su probabilidad asociada ( $p$ ).

Gen	Locus	Secuencias cebadores sentido y antisentido (5'- 3')	Tamaño fragmento amplificado (pb)	$E \pm SE E$	$R^2$	$r$
<i>CHS1</i>	Solyc09g091510	GGGCCTAAAGCCTGAGAAAC GGCCTTTCTCATTTTCATCCA	106	$1,953 \pm 0,02$	0,998	-0,999 ( $p = 4 \cdot 10^{-8}$ )
<i>CHS2</i>	Solyc05g053550	ATGAGAAAGGCCTCATCCAA TGGAGCACAAACAGTCTCAACA	110	$1,918 \pm 0,02$	0,999	-0,999 ( $p = 10^{-8}$ )
<i>CHS3</i>	Solyc01g090600	TTGGGCGCGTAATGCTCTAC TTATGACAGCAGCAGCTGGATTG	102	$2,012 \pm 0,03$	0,998	-0,999 ( $p = 3 \cdot 10^{-8}$ )
<i>CHS4</i>	Solyc01g111070	GATCTAACCCTGATTTCGAGATATCG CTTCAGTAAGCCTGCCATCAATG	108	$1,963 \pm 0,04$	0,995	-0,998 ( $p = 5 \cdot 10^{-7}$ )
<i>CHSA</i>	Solyc05g053170	GAGCTCAGCGATAGGGTTTC CCCAATTATAACCGCGACC	100	$1,986 \pm 0,05$	0,994	-0,997 ( $p = 10^{-6}$ )
<i>CHS5</i>	Solyc06g043120	CTGGTGAAGTAAGTGAGGCTG GAGTTTGGGAATGCTTCCACTAGG	105	$1,926 \pm 0,03$	0,996	-0,998 ( $p = 10^{-8}$ )
<i>CHS6</i>	Solyc06g043130	GGCCGACTACCAACTCACTAAG TAATTGAAGAGCAGTGCCACCAC	103	$1,996 \pm 0,04$	0,997	-0,998 ( $p = 2 \cdot 10^{-7}$ )
<i>CHS7</i>	Solyc12g098090	TGTCTTGAGTGCTATGGGA TTCGCCTGTGCTAATCAATC	103	$1,998 \pm 0,05$	0,992	-0,996 ( $p = 2 \cdot 10^{-6}$ )

Gen	Locus	Secuencias cebadores sentido y antisentido (5'-3')	Tamaño fragmento amplificado (pb)	$E \pm SE E$	R <sup>2</sup>	r
<i>chi</i>	Solyc02g067870	GAGATTGTGAGCAAGGTGGAAAG AACAGAGAGAGCATGGATGTCC	122	1,949 ± 0,03	0,997	-0,999 (p = 10 <sup>-7</sup> )
<i>CHI2</i>	Solyc05g010310	TGCAGAGAGACAGGCTATCG AGGAACTGAATCATCGTCAGAG	136	1,966 ± 0,04	0,995	-0,997 (p = 7 · 10 <sup>-7</sup> )
<i>CHI3</i>	Solyc05g010320	AGAGAATCACGTGTTCCCAC TTCCAAGTACACACCGATCG	139	1,978 ± 0,02	0,999	-0,999 (p = 10 <sup>-8</sup> )
<i>CHI4</i>	Solyc05g052240	CAATGGAAGGGCAAAACAGG TGCACACCATACTGTGAACC	134	1,921 ± 0,05	0,991	-0,996 (p = 2 · 10 <sup>-6</sup> )
<i>CHI5</i>	Solyc06g084260	ACGCATGACTATCAGGCTTC CAGATTCTTCGAAAGCACTGC	77	1,997 ± 0,03	0,997	-0,998 (p = 2 · 10 <sup>-7</sup> )
<i>CHI6</i>	Solyc07g062030	ACAATCAAAGCTGCTGCCTC CAGTTCCAAGCAATGACAAGG	130	1,915 ± 0,03	0,997	-0,998 (p = 2 · 10 <sup>-7</sup> )
<i>CHI7</i>	Solyc08g061480	TTGCTATGGAATCACACAGTGG AAACTCAATACCCGTTCTGGG	131	1,983 ± 0,03	0,997	-0,998 (p = 10 <sup>-8</sup> )
<i>F3H1</i>	Solyc02g083860	ACCACAAGGCTGGATAGGTG CTCTAAGCCCATTGCCTCTG	100	1,927 ± 0,01	0,999	-1,000 (p = 3 · 10 <sup>-9</sup> )
<i>F3H2</i>	Solyc03g080190	ATCGGAAGTGGTTCGATTGTG CTCTACAACCTTCTTTGGTACACC	148	1,893 ± 0,02	0,999	-0,999 (p = 10 <sup>-8</sup> )
<i>F3H3-FLS</i>	Solyc06g073080	TCCTCAGTGTCCACAACCTG CAGCCACTTGCAAATCTTGA	95	1,947 ± 0,02	1,000	-0,999 (p = 10 <sup>-8</sup> )
<i>F3H4-FLS</i>	Solyc09g066310	CCACCATGTCCAGATCCAAG GCACAGCTTCAACACACATC	139	1,898 ± 0,04	0,995	-0,998 (p = 5 · 10 <sup>-7</sup> )

Gen	Locus	Secuencias cebadores sentido y antisentido (5'-3')	Tamaño fragmento amplificado (pb)	$E \pm SE E$	R <sup>2</sup>	r
<i>F3H5</i>	Solyc10g005120	ACAAATGCTGGAAGATCCCG TCGCCATAAATCACTGGACG	113	1,889 ± 0,03	1,000	-0,998 (p = 3·10 <sup>-7</sup> )
<i>F3H6-FLS</i>	Solyc10g018170	TGCATGAAAGACCACTAGCTTC TCACAAGTTGTTGAGCGACAAC	96	1,880 ± 0,05	0,991	-0,996 (p = 3·10 <sup>-6</sup> )
<i>F3H7-FLS</i>	Solyc11g044820	CGCCTTAGCGGTAAACATAGG CGGATATTCGAGCCCTACTCG	107	1,959 ± 0,01	1,000	-1,000 (p = 5·10 <sup>-10</sup> )
<i>F3H8</i>	Solyc11g044830	TCTTCCAAGACAAAACGGGG CCTATGTAAACCACTAAGGCACC	100	1,994 ± 0,04	0,997	-0,998 (p = 2·10 <sup>-7</sup> )
<i>FLS1</i>	Solyc06g083910	TTGGCACTTGGAATGCATAG AATTGGTTCCACAGCAATCC	117	1,998 ± 0,04	0,997	-0,998 (p = 2·10 <sup>-7</sup> )
<i>CAC</i>	Solyc08g006960 <sup>1</sup>	CCTCCGTTGTGATGTAAGTGG ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG	173	1,931*	-	-
<i>EFa1</i>	Solyc06g005060 <sup>2</sup>	GATTGGTGGAAATTGGAAGTGC AGCTTCGTGGTGCATCTC	130	1,953*	-	-
<i>EXP</i>	Solyc07g025390 <sup>1</sup>	GCTAAGAACGCTGGACCTAATG TGGGTGTGCCTTTCTGAATG	183	1,874*	-	-
<i>SAND</i>	Solyc03g115810 <sup>1</sup>	TTGCTTGGAGGAACAGACG GCAAACAGAACCCCTGAATC	164	1,944*	-	-

Los cebadores han sido diseñados para esta memoria salvo aquellos indicados con superíndices que han sido tomados de la bibliografía:<sup>1</sup> Expósito-Rodríguez *et al.* (2008), <sup>2</sup> Rotenberg *et al.* (2006). \* datos tomados de Expósito-Rodríguez *et al.* (2008).



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



**Anexo II.** Secuencias de los cebadores empleados en los capítulos 2 y 3 de la presente memoria para el análisis de expresión mediante qPCR. Se incluye el tamaño del amplicón generado por cada pareja en pares de bases (pb).

Gen	Locus	Secuencias cebadores sentido y antisentido (5'-3')	Tamaño fragmento amplificado (pb)
<i>CUS1/GDSL2/CD1</i>	Solyc11g006250 <sup>1</sup>	GCAACACTTCATGTTGTGCTACTT CAATATCACACTCCACCCTACAAA	110
<i>CD2/pe</i>	Solyc01g091630	CCGTTTCCCCTCAAAGACTC GAGCCATTTCTTGCATAGGG	99
<i>CD3</i>	Solyc08g081220 <sup>2</sup>	TGAGCTGGTTCTTTTGGCTTG TGTGTCGTTGCCACGTGTCT	101
<i>CYP86A68</i>	Solyc01g094750 <sup>2</sup>	TTAAAGGGTCCACGTGTTTGG CACGCGCGGAGATTATCTACT	101
<i>CER1-like</i>	Solyc03g065250 <sup>3</sup>	TGACCATGGTTTTTCAGCCAAT TAACTCATAAGCCACCACATCAATG	100
<i>CER6</i>	Solyc02g085870	GGTTCTTCCAGCTTCAGAGC ATAACAGCTCTTCCACCAGC	144
<i>ABCG32</i>	Solyc05g018510	ATGACATCCACTCACCTTGC CTACGTCAACCTCTGATGGC	84
<i>BDG1</i>	Solyc08g083190	CACTCGGCCATCATTCCCTGT AGGAGCACCCATTTTGCCTT	124
<i>GDSL</i>	Solyc02g077330	TCCTGGAAACAACAACCATC TCTAGAAACGCTCTGGTCAT	165
<i>EST1</i>	Solyc03g119980	GCAAGTTGGGGTTATGCTGT CGGTCTTTTCCAAGTCTCCA	94

Gen	Locus	Secuencias cebadores sentido y antisentido (5'-3')	Tamaño fragmento amplificado (pb)
<i>SHN1</i>	Solyc03g116610	AATCTCTCTGTCTCGCTCG ATTTCAGCGACCCAAGAACC	128
<i>SHN2</i>	Solyc12g009490	AAAACGTGCTGGCCCTTCTT TGGGATTATTTTTCTTTTGAAGTTCA	71
<i>SHN3</i>	Solyc06g053230	ATGCAAAGCTGAGGAAATGTTG GATGTTTTTGGCACACTCCAA	100
<i>MYB12</i>	Solyc01g079620	AGGACCTATAGAGGCCAAGG CCACGTCTGGCATAATCTCC	83
<i>MYB30-like</i>	Solyc06g069850	CTGTCTTGATTTGACCGAGC CCCAAAGACCAACTACCCC	128
<i>MYB41</i>	Solyc07g054840	GTTCATCTTCATTGTCACGGC TTGTGGAGGTAGCATTGGC	83
<i>MYB96</i>	Solyc02g067340	TCCCACTAAAACAGGGTTGC TACCCCTCTTTATCCCTGGC	86
<i>PAL4</i>	Solyc09g007920	AACCGAGACCATAACTCATTTCG ATTGTCCATACTCCCGATGC	91
<i>PAL5</i>	Solyc09g007910 <sup>4</sup>	ATTGGGAAATGGCTGCTGATT TCAACATTTGCAATGGATGCA	142
<i>PAL6</i>	Solyc05g056170 <sup>4</sup>	TTGCTTGAAGGAATGGAATGG GCTTGCCTGTCTCAAATCC	139

Los cebadores han sido diseñados para esta memoria salvo aquellos indicados con superíndices que han sido tomados de la bibliografía: <sup>1</sup> Girard *et al.* (2013), <sup>2</sup> Shi *et al.* (2013), <sup>3</sup> Mintz-Oron *et al.* (2008), <sup>4</sup> Bovy *et al.* (2002).

**Anexo III.** Especies estudiadas en el análisis de proteínas CHS, CHI y F3H. Se indica el número de secuencias de cada una de ellas. Datos tomados del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

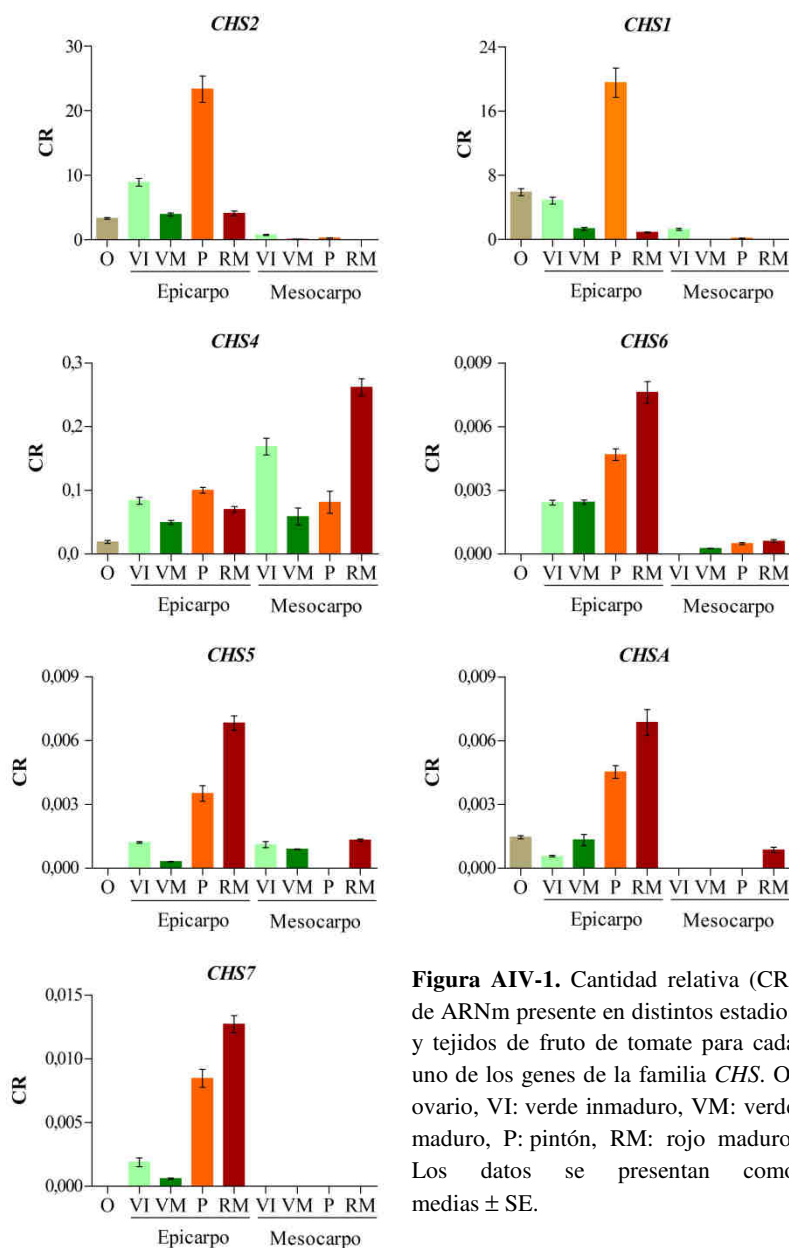
Espece	Secuencias CHS	Secuencias CHI	Secuencias F3H
<i>A. alpina</i>	-	-	1
<i>A. andraeanum</i>	-	-	1
<i>A. arborescens</i>	-	1	1
<i>A. archangelica</i>	-	-	1
<i>A. belladonna</i>	-	-	1
<i>A. chinensis</i>	-	-	1
<i>A. comosus</i>	-	-	1
<i>A. crysanthus</i>	-	1	-
<i>A. cynapium</i>	-	-	1
<i>A. duranensis</i>	-	-	3
<i>A. graveolens</i>	-	-	1
<i>A. ipaensis</i>	-	-	3
<i>A. lyrata</i>	-	-	3
<i>A. maximowiczianum</i>	1	-	-
<i>A. tanguticus</i>	-	-	1
<i>A. thaliana</i>	4	4	12
<i>B. arborea</i>	-	-	1
<i>B. distachyon</i>	-	-	1
<i>B. napus</i>	-	-	4
<i>B. oleracea</i>	-	-	2
<i>B. rapa</i>	-	-	1
<i>B. vulgaris</i>	2	-	-
<i>B. vulgaris</i>	-	-	5
<i>C. album</i>	-	-	1
<i>C. anuum</i>	9	10	5
<i>C. arietinum</i>	-	-	4
<i>C. cajan</i>	1	-	2
<i>C. canephora</i>	2	4	5
<i>C. capsularis</i>	1	-	-
<i>C. cardunculus</i>	-	-	1
<i>C. chekiangoleosa</i>	-	1	-
<i>C. clementina</i>	3	4	3
<i>C. cuminum</i>	-	-	1
<i>C. follicularis</i>	2	2	2
<i>C. jambhiri</i>	1	-	-
<i>C. maculatum</i>	-	-	1
<i>C. maxima</i>	-	-	2

Especie	Secuencias	Secuencias	Secuencias
	CHS	CHI	F3H
<i>C. melo</i>	-	-	2
<i>C. rubella</i>	-	-	1
<i>C. sativa</i>	-	-	4
<i>C. sativus</i>	-	1	3
<i>C. sinensis</i>	-	4	6
<i>C. tinctorius</i>	-	-	1
<i>D. brachyacantha</i>	-	1	1
<i>D. carota</i>	1	2	16
<i>D. caryophyllus</i>	-	-	1
<i>D. hygrometricum</i>	1	1	4
<i>D. longan</i>	-	-	1
<i>D. oligosanthos</i>	-	-	1
<i>D. solanacea</i>	-	1	1
<i>D. spathulata</i>	-	1	1
<i>D. stramonium</i>	-	-	1
<i>E. exaltatum</i>	-	-	1
<i>E. fasciculata</i>	-	-	1
<i>E. grandiflorum</i>	2	-	-
<i>E. grandis</i>	-	-	9
<i>E. guineensis</i>	-	-	2
<i>E. guttata</i>	-	5	5
<i>E. prostrata</i>	1	-	-
<i>E. salsugineum</i>	-	-	2
<i>F. vesca</i>	1	1	4
<i>G. arboretum</i>	-	2	-
<i>G. arboreum</i>	1	-	9
<i>G. biloba</i>	-	-	1
<i>G. hirsutum</i>	1	3	21
<i>G. max</i>	6	12	6
<i>G. raimondii</i>	-	3	16
<i>G. soja</i>	-	-	2
<i>G. triflora</i>	1	-	-
<i>H. cannabinus</i>	-	-	1
<i>H. niger</i>	-	-	1
<i>H. sabdariffa</i>	-	-	1
<i>H. vulgare</i>	-	-	2
<i>H. vulgare</i>	-	-	2
<i>I. australe</i>	-	1	1
<i>I. batatas</i>	-	-	4
<i>I. calycinum</i>	1	3	3
<i>I. confertiflorum</i>	-	1	1

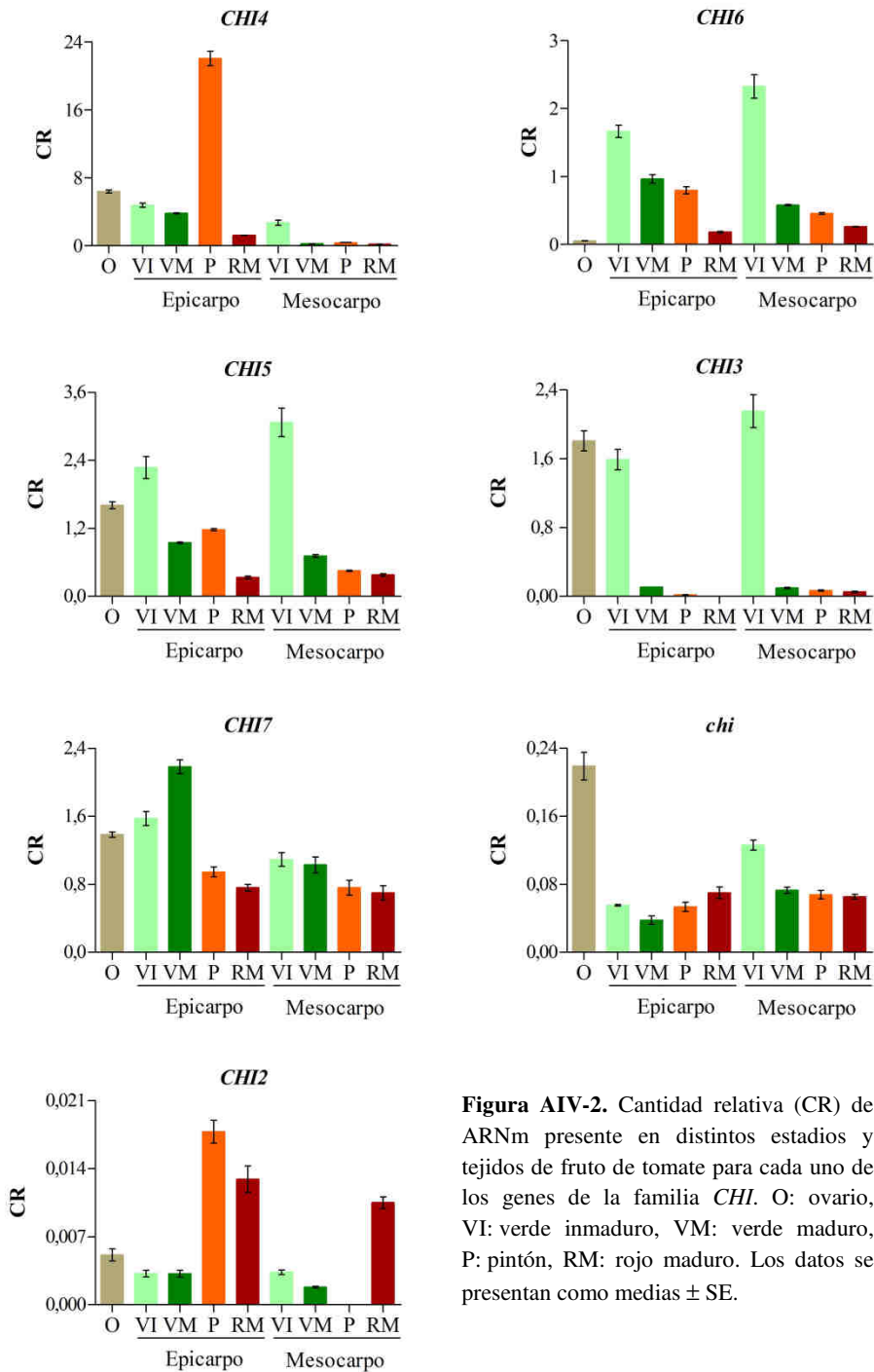
Especie	Secuencias	Secuencias	Secuencias
	CHS	CHI	F3H
<i>I. cornifolium</i>	-	1	1
<i>I. cyaneum</i>	2	1	1
<i>I. edule</i>	-	1	1
<i>I. ellipticum</i>	-	1	1
<i>I. gesnerioides</i>	-	1	1
<i>I. grandiflorum</i>	-	1	1
<i>I. nil</i>	1	4	4
<i>I. parvifolium</i>	-	1	1
<i>I. purpurea</i>	7	-	-
<i>I. squamosum</i>	-	1	1
<i>I. tupayachianum</i>	-	1	1
<i>I. umbellatum</i>	-	1	1
<i>J. curcas</i>	3	3	3
<i>J. regia</i>	1	1	5
<i>L. angustifolius</i>	-	-	2
<i>L. chinense</i>	-	1	2
<i>L. ruthenicum</i>	1	1	-
<i>M. acuminata</i>	-	-	2
<i>M. alba</i>	2	-	2
<i>M. domestica</i>	4	1	4
<i>M. esculenta</i>	2	4	2
<i>M. indica</i>	-	-	5
<i>M. notabilis</i>	1	1	5
<i>M. pumilus</i>	1	-	-
<i>M. truncatula</i>	-	-	7
<i>N. attenuata</i>	4	5	5
<i>N. benthamiana</i>	1	-	-
<i>N. caerulescens</i>	-	-	3
<i>N. crassa</i>	1	-	-
<i>N. grossedentata</i>	-	-	1
<i>N. nucifera</i>	-	3	4
<i>N. sylvestris</i>	6	7	4
<i>N. tabacum</i>	4	2	3
<i>N. tomentosiformis</i>	6	5	3
<i>Nierembergia sp. NB17</i>	-	-	1
<i>O. brachyantha</i>	-	-	1
<i>O. officinalis</i>	-	-	1
<i>O. sativa</i>	3	-	4
<i>O. viciifolia</i>	-	-	1
<i>P. crispum</i>	-	-	1
<i>P. americana</i>	-	-	1

Especie	Secuencias		
	CHS	CHI	F3H
<i>P. communis</i>	-	-	4
<i>P. dactylifera</i>	-	-	1
<i>P. euphratica</i>	2	2	10
<i>P. frutescens</i>	2	-	-
<i>P. hybrida</i>	13	1	1
<i>P. mume</i>	-	2	3
<i>P. patens</i>	15	-	-
<i>P. persica</i>	-	2	6
<i>P. pinaster</i>	1	-	-
<i>P. trichocarpa</i>	4	4	9
<i>P. vulgaris</i>	-	-	4
<i>Pyrus x bretschneideri</i>	-	-	4
<i>R. communis</i>	1	3	3
<i>R. rugosa</i>	-	-	1
<i>R. sativus</i>	-	-	2
<i>R. trigyna</i>	-	-	1
<i>S. baicalensis</i>	2	-	-
<i>S. bicolor</i>	-	-	1
<i>S. indicum</i>	1	4	5
<i>S. italica</i>	-	-	2
<i>S. lycopersicum</i>	6	7	7
<i>S. melongena</i>	-	1	1
<i>S. oleracea</i>	-	-	4
<i>S. pennellii</i>	5	9	6
<i>S. pinnatisectum</i>	-	-	1
<i>S. quitensis</i>	-	-	1
<i>S. tuberosum</i>	13	6	7
<i>S. viscidula</i>	1	-	-
<i>T. aestivum</i>	-	-	1
<i>T. cacao</i>	3	4	8
<i>T. hassleriana</i>	-	-	3
<i>T. urartu</i>	-	-	1
<i>V. angularis</i>	-	-	6
<i>V. ashei</i>	1	-	1
<i>V. breviflora</i>	-	1	1
<i>V. corymbosum</i>	-	-	1
<i>V. dichotoma</i>	-	1	1
<i>V. radiata</i>	-	-	5
<i>V. vinifera</i>	5	2	9
<i>Z. jujuba</i>	-	1	5
<i>Z. mays</i>	5	-	7

**Anexo IV.** Expresión de los distintos miembros de las familias génicas *CHALCONA SINTASA*, *CHALCONA ISOMERASA*, *FLAVANONA 3 HIDROXILASA* y *FLAVONOL SINTASA* en tejidos de raíz, hoja y fruto en diferentes estadios del desarrollo. Las eficiencias de los cebadores para el cálculo de las cantidades relativas se determinaron con el programa LinReg.

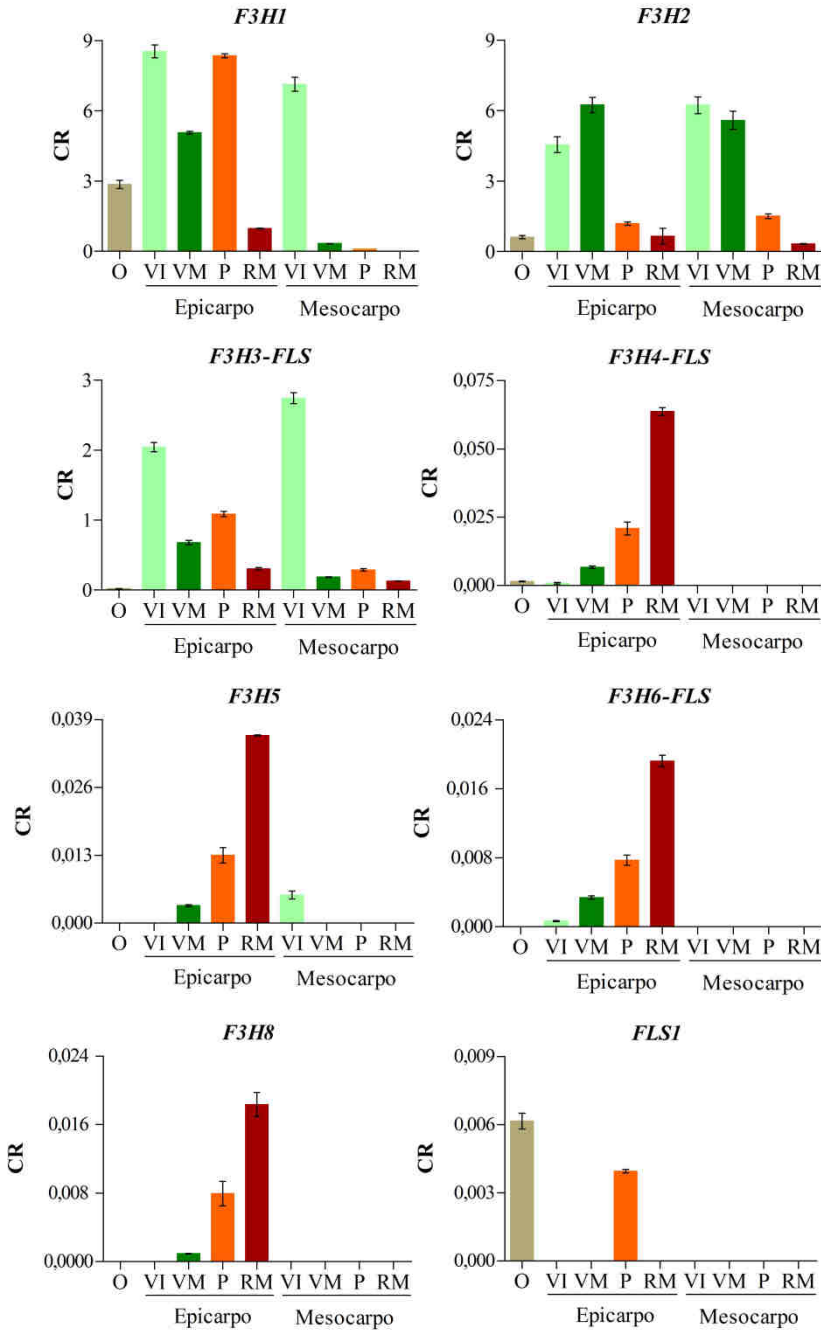


**Figura AIV-1.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios y tejidos de fruto de tomate para cada uno de los genes de la familia *CHS*. O: ovario, VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.

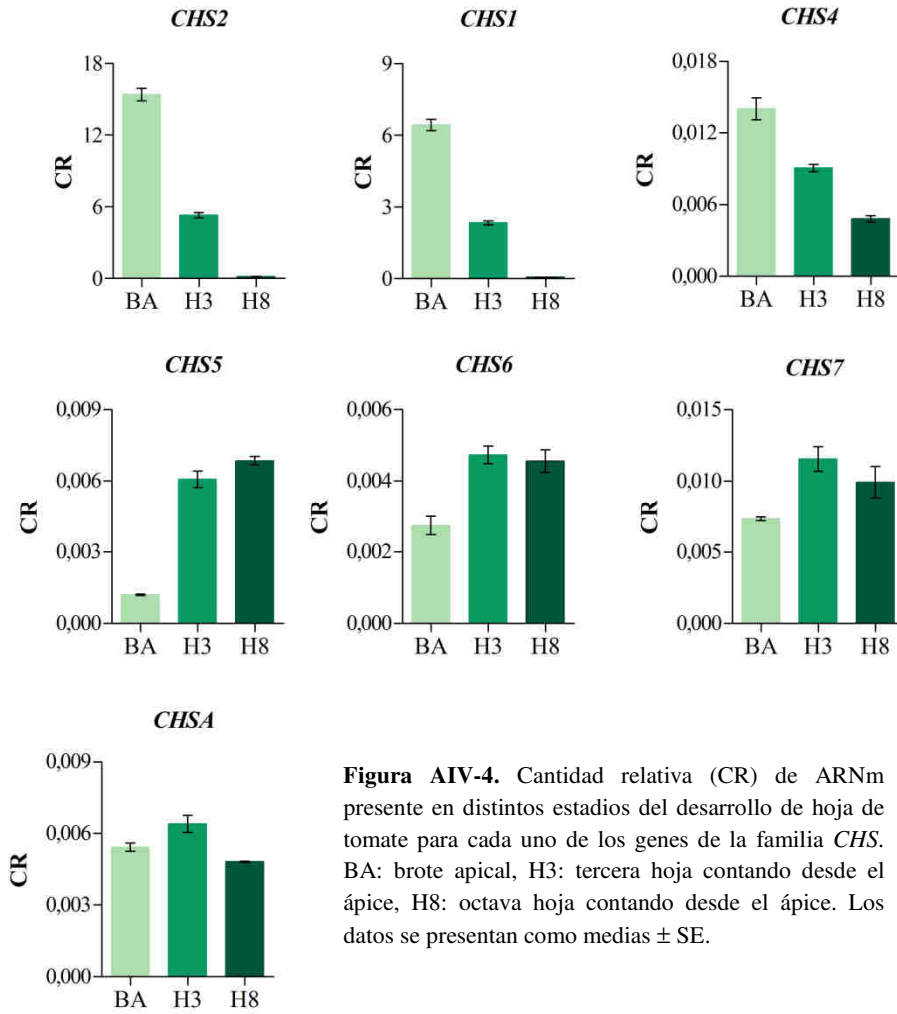


**Figura AIV-2.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios y tejidos de fruto de tomate para cada uno de los genes de la familia *CHI*. O: ovario, VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.

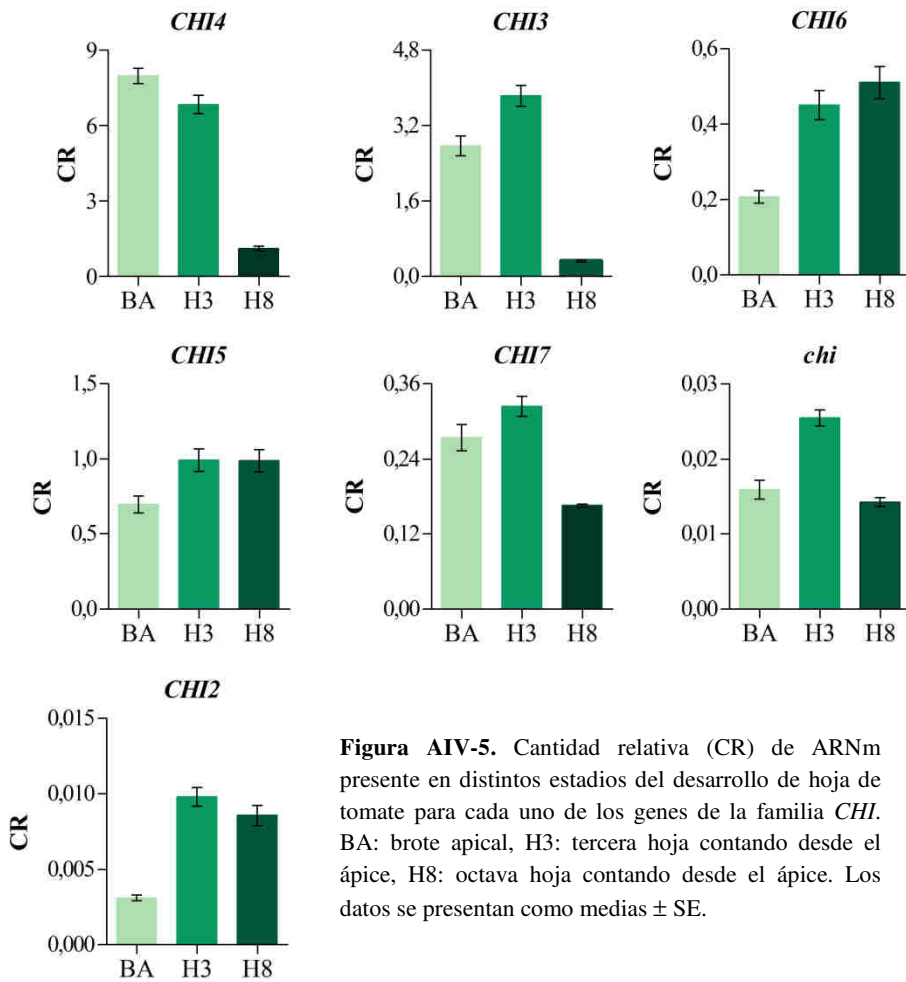




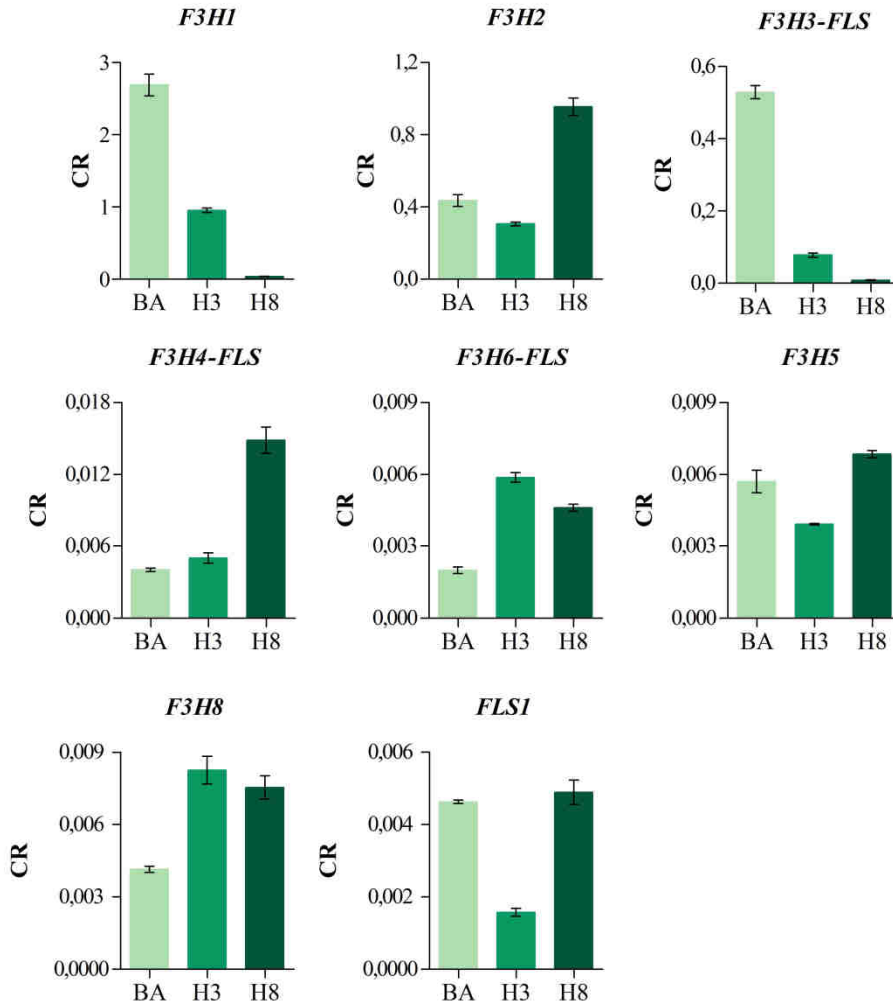
**Figura AIV-3.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios y tejidos de fruto de tomate para cada uno de los genes de las familias *F3H* y *FLS*. O: ovario, VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.



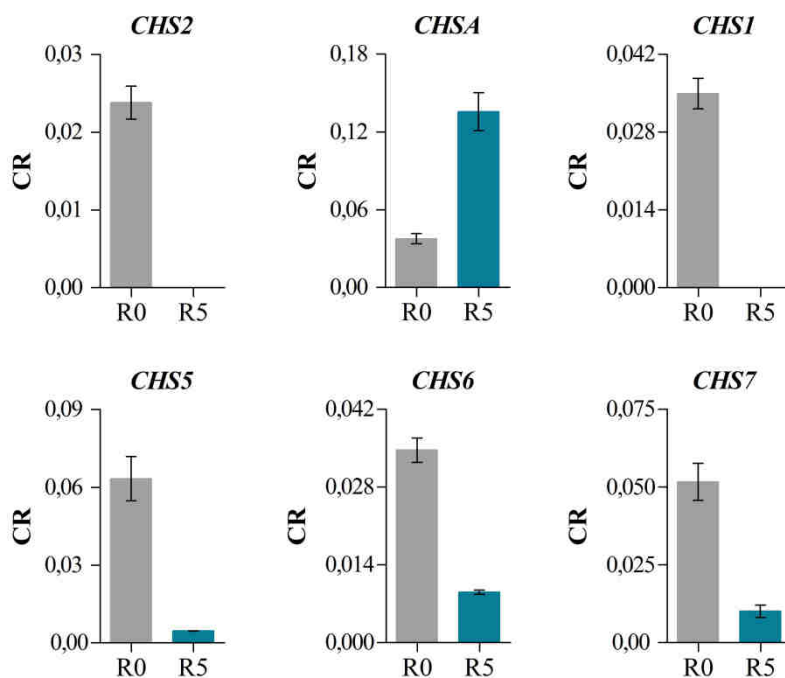
**Figura AIV-4.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de hoja de tomate para cada uno de los genes de la familia *CHS*. BA: brote apical, H3: tercera hoja contando desde el ápice, H8: octava hoja contando desde el ápice. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.



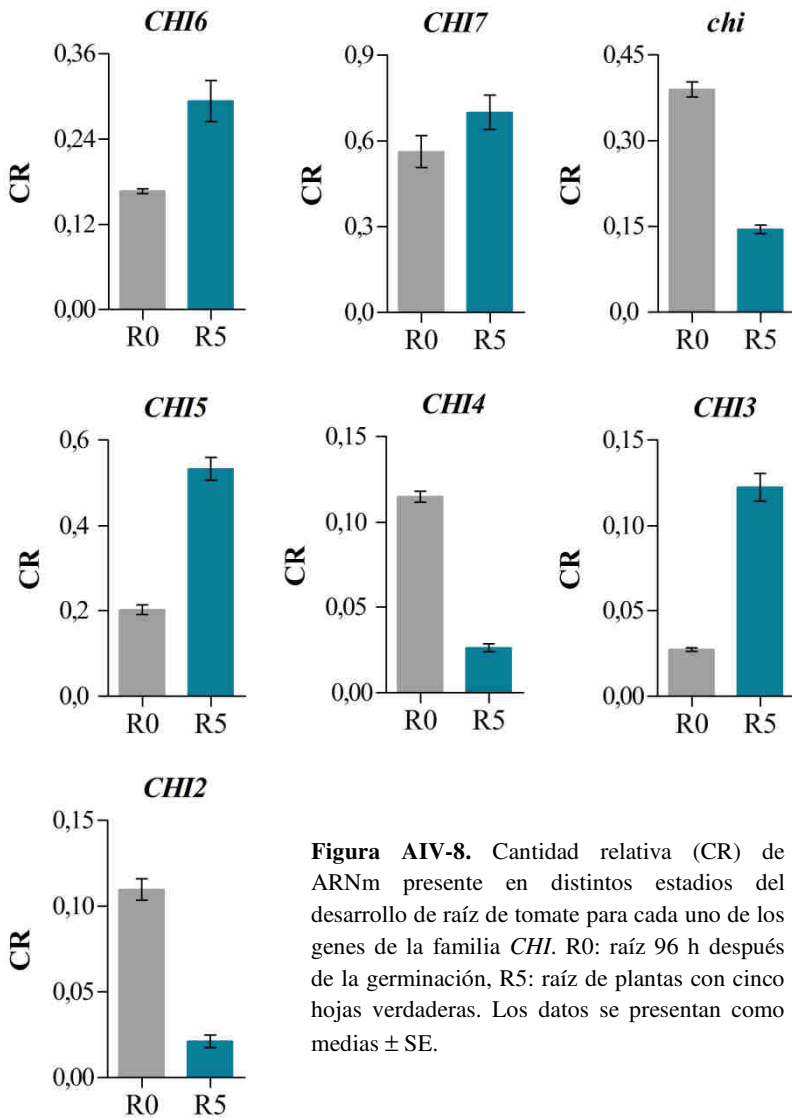
**Figura AIV-5.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de hoja de tomate para cada uno de los genes de la familia *CHI*. BA: brote apical, H3: tercera hoja contando desde el ápice, H8: octava hoja contando desde el ápice. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.



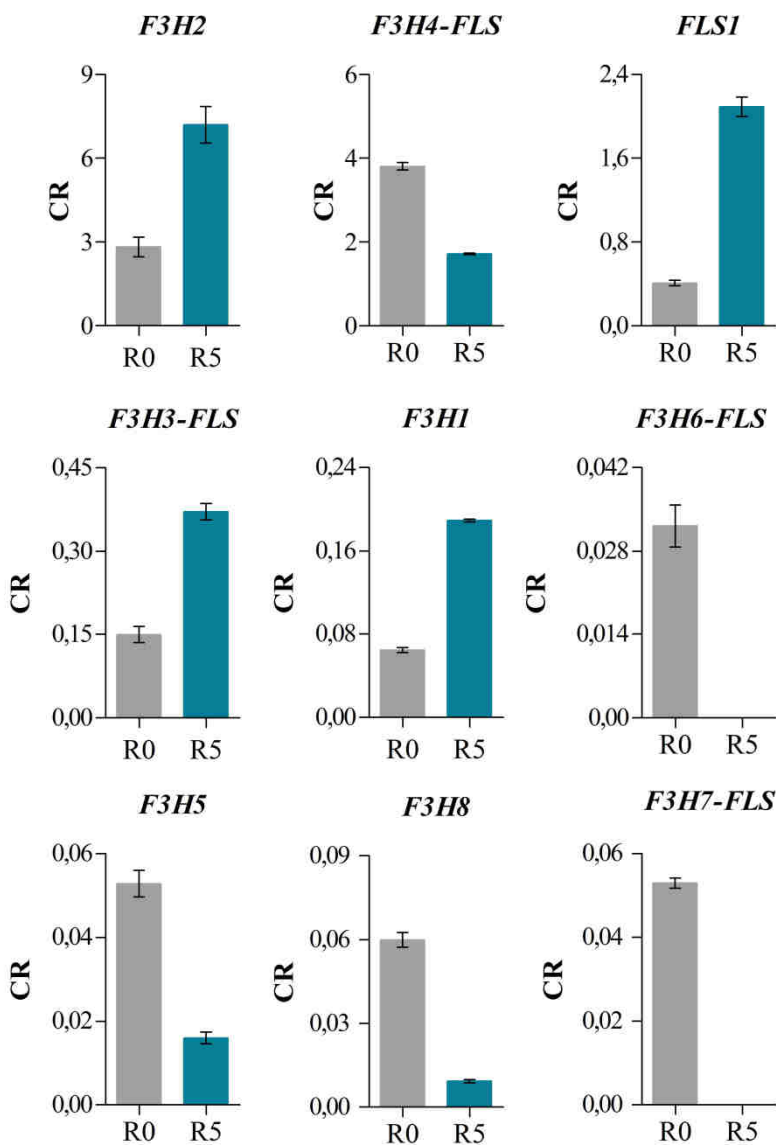
**Figura AIV-6.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de hoja de tomate para cada uno de los genes de las familias *F3H* y *FLS*. BA: brote apical, H3: tercera hoja contando desde el ápice, H8: octava hoja contando desde el ápice. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.



**Figura AIV-7.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de raíz de tomate para cada uno de los genes de la familia *CHS*. No se detectó amplificación de *CHS3* o *CHS4* en ninguno de los estadios. R0: raíz 96 h después de la germinación, R5: raíz de plantas con cinco hojas verdaderas. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.



**Figura AIV-8.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de raíz de tomate para cada uno de los genes de la familia *CHI*. R0: raíz 96 h después de la germinación, R5: raíz de plantas con cinco hojas verdaderas. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.



**Figura AIV-9.** Cantidad relativa (CR) de ARNm presente en distintos estadios del desarrollo de raíz de tomate para cada uno de los genes de las familias *F3H* y *FLS*. R0: raíz 96 h después de la germinación, R5: raíz de plantas con cinco hojas verdaderas. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



**Anexo V.** Expresión de los distintos miembros de las familias génicas *CHALCONA SINTASA (CHS)*, *CHALCONA ISOMERASA (CHI)*, *FLAVANONA 3 HIDROXILASA (F3H)* y *FLAVONOL SINTASA (FLS)* en tejidos de raíz, hoja y fruto en diferentes estadios del desarrollo. Información tomada de la base de datos *Tomato Functional Genome Database* (Universidad de Cornell, Ithaca, USA; <http://ted.bti.cornell.edu/>).

Se seleccionó la información procedente de los ensayos realizados con entradas de *S. lycopersicum* de fruto rojo. Los datos procedentes de los ensayos de microdissección láser de distintos tipos celulares de frutos de ‘Ailsa Craig’ 10dda (Matas *et al.*, 2011), de frutos de ‘Ailsa Craig’ en distintos estadios del desarrollo y de fruto y hoja de ‘M82’ (Zuluaga *et al.*, 2016) se determinaron mediante la técnica de pirosecuenciación 454 del transcriptoma. Los datos de expresión de fruto, hoja y raíz de ‘Heinz 1706’ proceden del análisis de la expresión génica mediante la tecnología RNA-seq Illumina (Tomato Genome Consortium, 2012). La información de fruto de ‘M82’ y ‘Ailsa Craig’ procede de un estudio del perfil transcriptómico de fruto de tomate (SRP004923, Boyce Thompson Institute).

En las siguientes tablas se muestran los valores de expresión normalizada como RPKM (*reads per kilobase of exon per million reads mapped*) para cada uno de los genes de la familias *CHS*, *CHI*, *F3H* y *FLS* procedentes de los ensayos arriba mencionados. En los ensayos realizados con ‘Ailsa Craig’ y ‘M82’ el estadio que se ha denominado rojo maduro corresponde a pintón más siete días mientras que en ‘Heinz 1706’ corresponde a pintón más 10 días. El material de fruto corresponde a pericarpo en el caso de ‘Ailsa Craig’ y ‘M82’ pero no está indicado para ‘Heinz 1706’. VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. El material de hoja de ‘M82’ procede de plantas con cuatro hojas verdaderas y el de ‘Heinz-1706’ de plantas con frutos. El estadio del desarrollo de la raíz de ‘Heinz 1706’ no está indicado.

## CHALCONA SINTASA

<i>CHS1</i>	'Ailsa Craig'	'Heinz 1706'	'M82'
Epicarpo 10dda	37,06	-	-
Mesocarpo 10dda	0	-	-
Endocarpo 10dda	0	-	-
Fruto 1 cm	0	173,65	-
Fruto 2 cm	-	102,78	-
Fruto 3 cm	-	3,20	-
Fruto VM	0	4,19	-
Fruto P	0	68,62	-
Fruto RM	0	91,90	0
Hoja	-	23,84	0
Raíz	-	0,18	-

<i>CHS2</i>	'Ailsa Craig'	'Heinz 1706'	M82
Epicarpo 10dda	1464,44	-	-
Mesocarpo 10dda	297,22	-	-
Endocarpo 10dda	78,89	-	-
Fruto 1 cm	11,67	117,04	-
Fruto 2 cm	-	162,45	-
Fruto 3 cm	-	30,40	-
Fruto VM	56,67	102,44	-
Fruto P	31,11	77,95	-
Fruto RM	5,00	163,04	73,89
Hoja	-	60,49	230,00
Raíz	-	0,25	-

<i>CHS4</i>	'Ailsa Craig'	'Heinz 1706'	M82
Epicarpo 10dda	0	-	-
Mesocarpo 10dda	49,17	-	-
Endocarpo 10dda	9,00	-	-
Fruto 1 cm	0	0	-
Fruto 2 cm	-	0	-
Fruto 3 cm	-	0	-
Fruto VM	0	0	-
Fruto P	0	0	-
Fruto RM	0	0	0
Hoja	-	0	0
Raíz	-	0	-

<i>CHSA</i>	'Ailsa Craig'	'Heinz 1706'	M82
Epicarpo 10dda	0	-	-
Mesocarpo 10dda	0	-	-
Endocarpo 10dda	0	-	-
Fruto 1 cm	0	0	-
Fruto 2 cm	-	0	-
Fruto 3 cm	-	0	-
Fruto VM	0	0	-
Fruto P	0	0	-
Fruto RM	0	0	0
Hoja	-	0	0
Raíz	-	9,66	-

<i>CHS7</i>	'Ailsa Craig'	'Heinz 1706'	M82
Epicarpo 10dda	37,06	-	-
Mesocarpo 10dda	0	-	-
Endocarpo 10dda	0	-	-
Fruto 1 cm	0	0	-
Fruto 2 cm	-	0	-
Fruto 3 cm	-	0	-
Fruto VM	0	0	-
Fruto P	0	0	-
Fruto RM	0	0	0
Hoja	-	0	0
Raíz	-	0	-

<i>CHS6</i>	'Ailsa Craig'	'Heinz 1706'	M82
Epicarpo 10dda	504,99	-	-
Mesocarpo 10dda	53,06	-	-
Endocarpo 10dda	0	-	-
Fruto 1 cm	0	0	-
Fruto 2 cm	-	0	-
Fruto 3 cm	-	0	-
Fruto VM	9,99	0	-
Fruto P	0	0	-
Fruto RM	0	0	27,47
Hoja	-	0	65,54
Raíz	-	0	-

<i>CHS5</i>	'Ailsa Craig'	'Heinz 1706'	M82
Epicarpo 10dda	37,06	-	-
Mesocarpo 10dda	0	-	-
Endocarpo 10dda	0	-	-
Fruto 1 cm	0	0	-
Fruto 2 cm	-	0	-
Fruto 3 cm	-	0	-
Fruto VM	0	0	-
Fruto P	0	0	-
Fruto RM	0	0	0
Hoja	-	0	0
Raíz	-	0	-

*CHALCONA ISOMERASA*

<i>chi</i>	'Ailsa Craig'	'Heinz 1706'	M82
Epicarpo 10dda	4,84	-	-
Mesocarpo 10dda	0	-	-
Endocarpo 10dda	0	-	-
Fruto 1 cm	0	0	-
Fruto 2 cm	-	0	-
Fruto 3 cm	-	0,05	-
Fruto VM	0	0	-
Fruto P	0	0	-
Fruto RM	0	0	0
Hoja	-	0,45	0
Raíz	-	0,05	-

<b>CHI2</b>	<b>'Ailsa Craig'</b>	<b>'Heinz 1706'</b>	<b>M82</b>
Epicarpo 10dda	0	-	-
Mesocarpo 10dda	0	-	-
Endocarpo 10dda	0	-	-
Fruto 1 cm	0	0	-
Fruto 2 cm	-	0	-
Fruto 3 cm	-	0,06	-
Fruto VM	0	0	-
Fruto P	0	0,11	-
Fruto RM	0	0	0
Hoja	-	0	0
Raíz	-	0,18	-

<b>CHI3</b>	<b>'Ailsa Craig'</b>	<b>'Heinz 1706'</b>	<b>M82</b>
Epicarpo 10dda	37,14	-	-
Mesocarpo 10dda	61,28	-	-
Endocarpo 10dda	82,64	-	-
Fruto 1 cm	79,85	82,59	-
Fruto 2 cm	-	48,26	-
Fruto 3 cm	-	40,49	-
Fruto VM	4,64	9,31	-
Fruto P	0	0,29	-
Fruto RM	0	0,16	0
Hoja	-	53,08	166,20
Raíz	-	3,77	-

<i>CHI4</i>	'Ailsa Craig'	'Heinz 1706'	M82
Epicarpo 10dda	187,50	-	-
Mesocarpo 10dda	65,97	-	-
Endocarpo 10dda	15,05	-	-
Fruto 1 cm	0	36,21	-
Fruto 2 cm	-	41,21	-
Fruto 3 cm	-	6,46	-
Fruto VM	0	15,23	-
Fruto P	0	17,21	-
Fruto RM	0	41,56	25,46
Hoja	-	57,27	35,88
Raíz	-	0,12	-

<i>CHI5</i>	'Ailsa Craig'	'Heinz 1706'	M82
Epicarpo 10dda	30,89	-	-
Mesocarpo 10dda	33,20	-	-
Endocarpo 10dda	74,90	-	-
Fruto 1 cm	33,20	36,97	-
Fruto 2 cm	-	45,63	-
Fruto 3 cm	-	27,06	-
Fruto VM	0	15,59	-
Fruto P	86,49	4,86	-
Fruto RM	6,95	3,17	16,99
Hoja	-	12,97	23,94
Raíz	-	10,80	-

<b>CHI6</b>	<b>'Ailsa Craig'</b>	<b>'Heinz 1706'</b>	<b>M82</b>
Epicarpo 10dda	4,27	-	-
Mesocarpo 10dda	28,16	-	-
Endocarpo 10dda	18,77	-	-
Fruto 1 cm	36,69	18,90	-
Fruto 2 cm	-	21,29	-
Fruto 3 cm	-	15,18	-
Fruto VM	31,57	12,83	-
Fruto P	0	8,34	-
Fruto RM	15,36	6,41	0
Hoja	-	5,61	5,12
Raíz	-	3,71	-

<b>CHI7</b>	<b>'Ailsa Craig'</b>	<b>'Heinz 1706'</b>	<b>M82</b>
Epicarpo 10dda	51,23	-	-
Mesocarpo 10dda	18,20	-	-
Endocarpo 10dda	1,69	-	-
Fruto 1 cm	0	9,79	-
Fruto 2 cm	-	13,80	-
Fruto 3 cm	-	9,32	-
Fruto VM	4,66	11,78	-
Fruto P	23,71	21,53	-
Fruto RM	0	16,95	0
Hoja	-	2,66	39,37
Raíz	-	6,28	-



## FLAVANONA 3 HIDROXILASA - FLAVONOL SINTASA

<i>F3H1</i>	'Ailsa Craig'	'Heinz 1706'	M82
Epicarpo 10dda	236,96	-	-
Mesocarpo 10dda	119,63	-	-
Endocarpo 10dda	23,77	-	-
Fruto 1 cm	0	75,35	-
Fruto 2 cm	-	89,57	-
Fruto 3 cm	-	22,56	-
Fruto VM	28,37	53,66	-
Fruto P	0	97,18	-
Fruto RM	0	48,17	0
Hoja	-	36,53	75,92
Raíz	-	4,20	-

<i>F3H2</i>	'Ailsa Craig'	'Heinz 1706'	M82
Epicarpo 10dda	11,98	-	-
Mesocarpo 10dda	0	-	-
Endocarpo 10dda	0	-	-
Fruto 1 cm	141,40	4,22	-
Fruto 2 cm	-	7,15	-
Fruto 3 cm	-	4,74	-
Fruto VM	28,76	3,93	-
Fruto P	0	1,46	-
Fruto RM	0	1,25	0
Hoja	-	4,68	47,93
Raíz	-	15,03	-

<b><i>F3H8</i></b>	<b>'Ailsa Craig'</b>	<b>'Heinz 1706'</b>	<b>M82</b>
Epicarpo 10dda	22,05	-	-
Mesocarpo 10dda	125,39	-	-
Endocarpo 10dda	64,27	-	-
Fruto 1 cm	94,52	0	-
Fruto 2 cm	-	0	-
Fruto 3 cm	-	0	-
Fruto VM	10,08	0	-
Fruto P	105,23	0	-
Fruto RM	0	0	13,86
Hoja	-	0	15,75
Raíz	-	0	-

<b><i>F3H3-FLS</i></b>	<b>'Ailsa Craig'</b>	<b>'Heinz 1706'</b>	<b>M82</b>
Epicarpo 10dda	7,56	-	-
Mesocarpo 10dda	0	-	-
Endocarpo 10dda	0	-	-
Fruto 1 cm	15,87	0,7	-
Fruto 2 cm	-	19,96	-
Fruto 3 cm	-	9,12	-
Fruto VM	3,78	0,15	-
Fruto P	0	0	-
Fruto RM	6,80	0	0
Hoja	-	0	0
Raíz	-	0	-

<i>F3H4-FLS</i>	'Ailsa Craig'	'Heinz 1706'	M82
Epicarpo 10dda	0	-	-
Mesocarpo 10dda	0	-	-
Endocarpo 10dda	0	-	-
Fruto 1 cm	0	0	-
Fruto 2 cm	-	0	-
Fruto 3 cm	-	0	-
Fruto VM	0	0	-
Fruto P	0	0	-
Fruto RM	0	0	0
Hoja	-	0	0
Raíz	-	2,87	-

<i>F3H6-FLS</i>	'Ailsa Craig'	'Heinz 1706'	M82
Epicarpo 10dda	0	-	-
Mesocarpo 10dda	22,89	-	-
Endocarpo 10dda	32,71	-	-
Fruto 1 cm	0	0	-
Fruto 2 cm	-	0	-
Fruto 3 cm	-	0	-
Fruto VM	0	0	-
Fruto P	0	0	-
Fruto RM	0	0	0
Hoja	-	2,20	25,35
Raíz	-	0	-

<i>F3H7-FLS</i>	'Ailsa Craig'	'Heinz 1706'	M82
Epicarpo 10dda	22,05	-	-
Mesocarpo 10dda	125,39	-	-
Endocarpo 10dda	64,27	-	-
Fruto 1 cm	94,52	0	-
Fruto 2 cm	-	0	-
Fruto 3 cm	-	0	-
Fruto VM	10,08	0	-
Fruto P	105,23	0	-
Fruto RM	0	0	13,86
Hoja	-	0	15,75
Raíz	-	0	-

<i>FLSI</i>	'Ailsa Craig'	'Heinz 1706'	M82
Epicarpo 10dda	0	-	-
Mesocarpo 10dda	0	-	-
Endocarpo 10dda	0	-	-
Fruto 1 cm	0	0,05	-
Fruto 2 cm	-	0	-
Fruto 3 cm	-	0	-
Fruto VM	0	0	-
Fruto P	0	0	-
Fruto RM	0	0	0
Hoja	-	0,04	0
Raíz	-	74,70	-

**Anexo VI.** Cantidad de cutícula y de cada uno de sus componentes de plantas de MM control, *CHIOx* y *CHI/FNSox* cultivadas en invierno.

**Tabla AVI-1.** Cantidad de cutícula y de sus principales componentes, cutina, polisacáridos, ceras y fenoles, de frutos en cuatro estadios de desarrollo procedentes de plantas de MM control y plantas homocigotas *CHIOx* y *CHI/FNSox*. Los valores se expresan en  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre genotipos para un mismo estadio ( $p \leq 0,05$ ).

	MM	<i>CHIOx</i>	<i>CHI/FNSox</i>
<b>Cutícula</b>			
VI	569,1 $\pm$ 10,1 b	650,9 $\pm$ 21,1 a	692,9 $\pm$ 29,9 a
VM	947,4 $\pm$ 37,6 b	1239,7 $\pm$ 36,5 a	1269,2 $\pm$ 47,0 a
P	945,0 $\pm$ 31,9 b	919,9 $\pm$ 23,1 b	1255,9 $\pm$ 50,2 a
RM	1043,8 $\pm$ 48,4 b	1120,1 $\pm$ 39,1 b	1634,8 $\pm$ 28,6 a
<b>Cutina</b>			
VI	350,6 $\pm$ 6,2 b	405,2 $\pm$ 13,1 a	442,1 $\pm$ 19,1 a
VM	599,5 $\pm$ 23,8 b	889,2 $\pm$ 26,2 a	850,2 $\pm$ 31,5 a
P	612,8 $\pm$ 20,7 b	681,1 $\pm$ 17,1 b	864,0 $\pm$ 34,5 a
RM	658,8 $\pm$ 30,6 c	801,4 $\pm$ 28,0 b	1103,8 $\pm$ 19,3 a
<b>Polisacáridos</b>			
VI	210,2 $\pm$ 3,7 b	236,3 $\pm$ 7,7 ab	243,4 $\pm$ 10,5 a
VM	321,4 $\pm$ 12,8 b	316,4 $\pm$ 9,3 b	384,4 $\pm$ 14,2 a
P	307,1 $\pm$ 10,4 a	215,6 $\pm$ 5,4 b	342,8 $\pm$ 13,7 a
RM	353,8 $\pm$ 16,4 b	286,8 $\pm$ 10,0 c	444,2 $\pm$ 7,8 a
<b>Ceras</b>			
VI	8,3 $\pm$ 0,1 b	9,4 $\pm$ 0,3 a	7,4 $\pm$ 0,3 b
VM	26,5 $\pm$ 1,1 b	34,2 $\pm$ 1,0 a	34,6 $\pm$ 1,3 a
P	25,1 $\pm$ 0,8 b	23,2 $\pm$ 0,6 b	49,1 $\pm$ 2,0 a
RM	31,1 $\pm$ 1,4 b	31,9 $\pm$ 1,1 b	86,8 $\pm$ 1,5 a
<b>Fenoles</b>			
VI	8,9 $\pm$ 0,3 b	10,7 $\pm$ 0,5 a	9,8 $\pm$ 0,1 ab
VM	17,5 $\pm$ 0,8 a	23,1 $\pm$ 2,1 a	19,6 $\pm$ 0,5 a
P	35,0 $\pm$ 2,0 a	18,9 $\pm$ 1,4 b	22,8 $\pm$ 1,2 b
RM	59,0 $\pm$ 1,1 a	23,9 $\pm$ 0,2 c	31,2 $\pm$ 1,3 b

**Tabla AVI-2.** Cantidad de cutícula y de sus principales componentes, cutina, polisacáridos, ceras y fenoles, de frutos en cuatro estadios de desarrollo procedentes de plantas *CHIo*x hemicigotas y homocigotas. Los valores se expresan en  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre hemicigotas y homocigotas para un mismo estadio: \*:  $0,05 \geq p > 0,01$ , \*\*  $p \leq 0,01$ .

<i>CHIo</i> x		
	hemicigota	homocigota
<b>Cutícula</b>		
VI	576,1 $\pm$ 16,5 *	650,9 $\pm$ 21,1
VM	1271,6 $\pm$ 35,1	1239,7 $\pm$ 36,5
P	1052,7 $\pm$ 32,5	919,9 $\pm$ 23,1 **
RM	1277,8 $\pm$ 31,7	1120,1 $\pm$ 39,1 **
<b>Cutina</b>		
VI	346,1 $\pm$ 9,9 **	405,2 $\pm$ 13,1
VM	823,4 $\pm$ 22,7	889,2 $\pm$ 26,2
P	690,1 $\pm$ 21,3	681,1 $\pm$ 17,1
RM	834,2 $\pm$ 20,7	801,4 $\pm$ 28,0
<b>Polisacáridos</b>		
VI	224,1 $\pm$ 6,4	236,3 $\pm$ 7,7
VM	419,7 $\pm$ 11,6	316,4 $\pm$ 9,3 **
P	329,8 $\pm$ 10,2	215,6 $\pm$ 5,4 **
RM	402,1 $\pm$ 10,0	286,8 $\pm$ 10,0 **
<b>Ceras</b>		
VI	5,9 $\pm$ 0,2 **	9,4 $\pm$ 0,3
VM	28,5 $\pm$ 0,8 **	34,2 $\pm$ 1,0
P	32,9 $\pm$ 1,0	23,2 $\pm$ 0,6 **
RM	41,5 $\pm$ 1,0	31,9 $\pm$ 1,1 **
<b>Fenoles</b>		
VI	8,9 $\pm$ 0,2 *	10,7 $\pm$ 0,5
VM	22,1 $\pm$ 1,4	23,1 $\pm$ 2,1
P	20,1 $\pm$ 0,7	18,9 $\pm$ 1,4
RM	23,9 $\pm$ 1,6	23,9 $\pm$ 0,2

**Tabla AVI-3.** Cantidad de cutícula y de sus principales componentes, cutina, polisacáridos, ceras y fenoles, de frutos en cuatro estadios de desarrollo procedentes de plantas *CHI/FNSox* hemicigotas y homocigotas. Los valores se expresan en  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . VI: verde inmaduro, VM: verde maduro, P: pintón, RM: rojo maduro. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre hemicigotas y homocigotas para un mismo estadio: \*:  $0,05 \geq p > 0,01$ , \*\*  $p \leq 0,01$ .

<i>CHI/FNSox</i>		
	hemicigota	homocigota
<b>Cutícula</b>		
VI	588,5 $\pm$ 26,4 *	692,9 $\pm$ 29,9
VM	1163,4 $\pm$ 32,0	1269,2 $\pm$ 47,0
P	1161,4 $\pm$ 36,2	1255,9 $\pm$ 50,2
RM	1685,2 $\pm$ 39,7	1634,8 $\pm$ 28,6
<b>Cutina</b>		
VI	371,4 $\pm$ 16,7 *	442,1 $\pm$ 19,1
VM	827,0 $\pm$ 22,8	850,2 $\pm$ 31,5
P	815,2 $\pm$ 25,4	864,0 $\pm$ 34,5
RM	1178,9 $\pm$ 27,8	1103,8 $\pm$ 19,3 *
<b>Polisacáridos</b>		
VI	211,7 $\pm$ 9,5 **	243,4 $\pm$ 10,5
VM	305,9 $\pm$ 8,4 **	384,4 $\pm$ 14,2
P	307,0 $\pm$ 9,6 *	342,8 $\pm$ 13,7
RM	440,6 $\pm$ 10,4	444,2 $\pm$ 7,8
<b>Ceras</b>		
VI	5,4 $\pm$ 0,2 **	7,4 $\pm$ 0,3
VM	30,5 $\pm$ 0,8 *	34,6 $\pm$ 1,3
P	39,2 $\pm$ 1,2 **	49,1 $\pm$ 2,0
RM	65,7 $\pm$ 1,5 **	86,8 $\pm$ 1,5
<b>Fenoles</b>		
VI	8,4 $\pm$ 0,3 **	9,8 $\pm$ 0,1
VM	16,6 $\pm$ 0,3 **	19,6 $\pm$ 0,5
P	19,0 $\pm$ 0,3 *	22,8 $\pm$ 1,2
RM	27,8 $\pm$ 1,0	31,2 $\pm$ 1,3



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



**CSIC**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

