

UNIVERSITAT JAUME I

Escola Superior de Tecnologia i Ciències Experimentals



ENGINYERIA AGROALIMENTÀRIA

I DEL MEDI RURAL

**Cribado de germoplasma de tomate y especies silvestres
relacionadas para su uso en programas de mejora de tomate con
elevado contenido en ácido L-ascórbico**

Estudiant: David Drago Domenech

Tutor: Salvador Roselló Ripollés

Convocatòria: Juliol 2014

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL CULTIVO DEL TOMATE	1
1.1.1. Origen del cultivo	1
1.1.2. Importancia del cultivo	2
1.2. PROGRAMAS DE MEJORA DEL TOMATE: ANTECEDENTES Y EVOLUCIÓN	5
1.3. CALIDAD FUNCIONAL	6
1.3.1. Componentes fenólicos	7
1.3.2. Pigmentos	8
1.3.3. Vitaminas	9
1.4. BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO L-ASCÓRBICO EN PLANTAS	12
1.5. PERSPECTIVAS DE MEJORA DEL VALOR FUNCIONAL DEL TOMATE AUMENTANDO EL CONTENIDO DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO	15
1.5.1. Cuantificación rápida y precisa de ácido L-ascórbico	15
1.5.2. Uso de transgénesis	15
1.5.3. Uso de la variabilidad presente en germoplasma de tomate y especies relacionadas	16
2. OBJETIVO	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. MATERIAL VEGETAL	22
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y CONDICIONES DE CULTIVO	23
3.3. MUESTREO Y PROCESADO DE LA MUESTRA	25
3.4. DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO L-ASCÓRBICO	25
3.5. ANÁLISIS DE DATOS	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1. MEDIAS FENOTÍPICAS DE LOS CONTENIDOS DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO EN LAS ENTRADAS ESTUDIADAS	28
4.2. ESTIMA DE LOS COMPONENTES DE LA VARIANZA FENOTÍPICA DE LOS CARACTERES	32
4.3. PREDICCIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN GENOTÍPICA, AMBIENTAL Y DE INTERACCIÓN GENOTIPO X AMBIENTE EN CADA ENTRADA	34
5. CONCLUSIONES	41
6. BIBLIOGRAFÍA	41

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.1. Gráfico de la producción por continentes en los años 2010, 2011 y 2012</i>	3
<i>Figura 1.2. Gráfico porcentual de la producción de tomate en 2012 por zonas y por países</i>	3
<i>Figura 1.3. Evolución de la producción de tomate en España (miles de toneladas)</i>	4
<i>Figura 1.4. Producción de tomate en España por Comunidades Autónomas</i>	5
<i>Figura 1.5. Estructura molecular del ácido L-ascórbico (www.chemheritage.org)</i>	12
<i>Figura 1.6. Rutas biosintéticas del ácido L-ascórbico en plantas (Agius, F. et al, 2003). Las enzimas en cada ruta son, 1: fosfoglucomutasa; 7: gluconolactonasa; 8: gulono-1,4-lactona deshidrogenasa; 9: glucosa-6-fosfato isomerasa; 10: manosa-6-fosfato isomerasa; 11: fosfomanosa mutasa; 12: GDP-manosa pirofosforilasa; 13: GDP-manosa-3,5-epimerasa; 14: GDP-L-galactosa fosforilasa; 15: L-galactosa-1-fosfato fosfatasa; 16: L-galactosa deshidrogenasa; 17: L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa; 18: metilesterasa; 19: D-galacturonato reductasa; 20: aldonolactonasa; 21: fosfodiesterasa; 22: sugar-phosphatase; 23: L-gulosa deshidrogenasa; 24: myo-inositol oxigenasa.</i>	13
<i>Figura 1.7. Esquema de las rutas de reciclaje del ácido L-ascórbico (Alós, E. et al, 2013).</i>	14
<i>Figura 3.1. Esquema de la migración de moléculas en un equipo de electroforesis capilar.</i>	26
<i>Figura 3.2. Electroferograma donde se observa la separación del pico de ácido L-ascórbico en una muestra de tomate.</i>	26
<i>Figura 4.1. Efectos genotípicos y de interacción genotipo x ambiente para el contenido de ácido L-ascórbico de las entradas estudiadas. Valor estimado significativamente diferente de cero (t-test) para ⁺P = 0.1, *P = 0.05, **P = 0.01. Los controles en el eje de las X están dentro de rectángulos. Las líneas horizontales de referencia marcan los controles de mayor y de menor expresión genotípica (G) de ácido L-ascórbico; μ, media general; E1, Castellón-aire libre; E2, Valencia-invernadero. Las especies estudiadas son: 1, <i>Solanum pimpinellifolium</i>; 2, <i>Solanum neorickii</i>; 3, <i>Solanum chmielewskii</i>; Controles, <i>Solanum lycopersicum</i> en FORTUNA-C y UJI026 y <i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> en UJI027.</i>	35

ÍNDICE DE IMÁGENES

<i>Imagen 1. Origen y rutas de propagación del tomate a partir del siglo XVI (Nuez, F., et al. 1996)</i>	1
<i>Imagen 3.1. Ensayo en Castellón al aire libre. Parcela experimental de la UJI</i>	23
<i>Imagen 3.2. Ensayo en Valencia en invernadero</i>	23
<i>Imagen 3.3. Imagen de las plantas tras el trasplante a campo, entutoradas con cañas. Arriba-izquierda: herramienta de cinta para atar las plantas a la caña. Abajo-derecha: herramienta para pinchar la tubería y montar los emisores.</i>	24
<i>Imagen 3.4. Frutos de Solanum lycopersicum muestreados en estadio de rojo maduro.</i>	25
<i>Imagen 3.5. Conjunto de trituradoras utilizadas para procesar la muestra y prepararla para almacenarla a -20 °C.</i>	25
<i>Imagen 3.6. Caja llena de microtubos. Arriba-izquierda: microtubo de centrifugación con muestra triturada</i>	25
<i>Imagen 3.7. Cajas llenas de microtubos almacenadas a -20 °C.</i>	25
<i>Imagen 3.8. Equipo de CZE utilizado para el análisis de muestras.</i>	26

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.1. Superficie cultivada y producción de tomate en el mundo en los años 2010, 2011 y 2012.</i>	2
<i>Tabla 1.2. Contenido en vitaminas y antioxidantes de algunas frutas y verduras en mg·Kg⁻¹ de peso fresco (Adalid et al, 2004)</i>	7
<i>Tabla 1.3. Contenido vitamínico del tomate (Modificado de Davies y Hobson, 1981)</i>	9
<i>Tabla 1.4. Contenido de ácido L-ascórbico en frutos de tomate a diferentes estados de madurez y temperaturas de almacenamiento (adaptada de Hamner et al, 1945)</i>	18
<i>Tabla 3.1. Características de las entradas evaluadas</i>	22
<i>Tabla 4.1. Contenido fenotípico (media ± error típico, mg·kg⁻¹ de peso fresco) de ácido L ascórbico en las entradas evaluadas de cada ambiente</i>	28
<i>Tabla 4.2. Estima del valor los componentes de la varianza (y porcentaje sobre el total de la varianza fenotípica) para el contenido de ácido L-ascórbico de frutos de tomate</i>	32

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CULTIVO DEL TOMATE

1.1.1. Origen del cultivo

El tomate tiene su centro de origen en la región andina, entre Chile y Colombia, donde se encontró creciendo de forma silvestre, al igual que todas las otras especies del género *Solanum* (Imagen 1).

Su domesticación habría ocurrido en México, a partir del tomate cereza (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) que crece espontáneamente en toda la América tropical y subtropical. Desde esta zona y con el nombre vulgar de tomate (derivado de tomatl en el lenguaje Nahuatl de México), fue llevado a Europa a inicios del siglo XVI, donde fue considerada como planta venenosa por la presencia de tomatina, un alcaloide presente en sus hojas y frutos inmaduros. Por esto, inicialmente se usó sólo como planta ornamental y en los siglos siguientes, al comprobarse la inocuidad del alcaloide, pasó a constituirse en un producto central en la alimentación de países europeos, en especial los de la zona mediterránea.

En la actualidad, es una especie de gran y creciente importancia en el mundo, donde destacan China, India, Estados Unidos y Egipto, como los países de mayor superficie cultivada y, al mismo tiempo, como ejemplos de su amplia distribución actual.

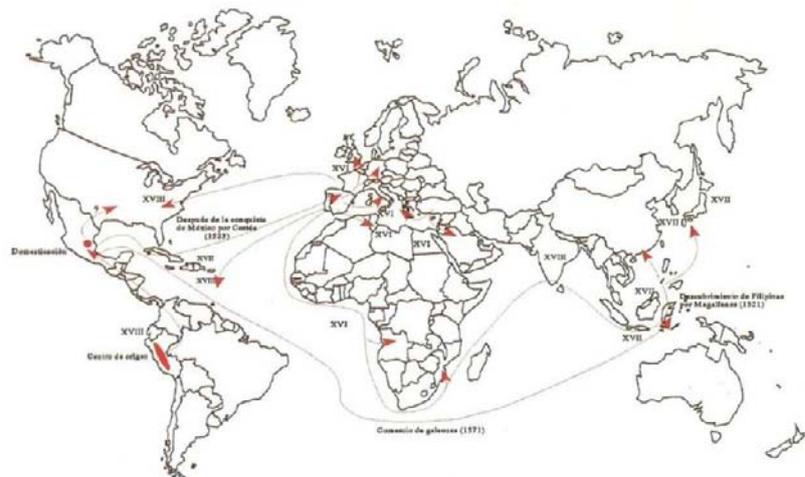


Imagen 1. Origen y rutas de propagación del tomate a partir del siglo XVI (Nuez, F. et al. 1996)

1. Introducción

1.1.2. Importancia del cultivo

El tomate es una hortaliza conocida en los mercados de todo el mundo, de uso diario casi imprescindible y la hortaliza más consumida del planeta.

Las tres categorías principales de tomate para consumo son el tomate fresco, el tomate procesado y el tomate con aplicaciones farmacéuticas y sus usos principales son los siguientes (MAGRAMA, 2014):

- Consumo humano directo: Se consume crudo, entero o en rebanadas, y solo o en ensaladas, salsas, sopas y purés. Se prepara ocasionalmente en zumo casero solo o mezclado.
- Procesado industrial: Se puede pelar, cortar en dados, concentrar, deshidratar, congelar, encurtir, envasar o enlatar al natural o en salmuera. Deshidratado, forma parte de alimentos precocidos como las sopas instantáneas. Gran parte se concentra con destino a la industria productora de salsas.
- Industria farmacéutica: complementos nutraceuticos (comprimidos con licopeno)

El cultivo de esta hortaliza es el más difundido en todo el mundo y el de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada.

En el 2.010 la producción de tomate fue de 152.007.674,37 toneladas ocupando una superficie total de cultivo de 4.539.760,89 de hectáreas. En 2.011, tanto la producción como la superficie cultivaba sufrieron un aumento del casi 4%, mientras en 2.012 prosiguió este incremento (Tabla 1.1). (FAOSTAT, 2014).

	2.010	2.011	2.012
Superficie cultivada (Ha)	4,539,760.89	4,723,066.86	4,803,680.17
Producción (Tn)	152,007,674.37	158,019,580.71	161,793,834.18

Tabla 1.1. Superficie cultivada y producción de tomate en el mundo en los años 2010, 2011 y 2012.

En cuanto a la producción por continentes (Figura 1.1), el mayor productor es Asia con más del 50% de producción de tomate. Además podemos visualizar que el cultivo de tomate se va incrementando año tras año. A continuación, con unos porcentajes mucho menores y significativos encontramos a Europa, África y América con un 15% sobre la producción mundial. Finalmente Oceanía aporta menos del 1% en cuanto a producción de tomate se refiere. (FAOSTAT, 2014).

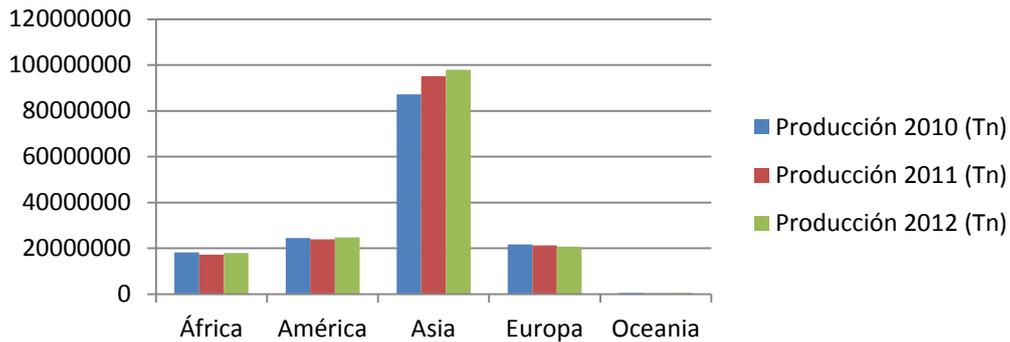


Figura 1.1. Gráfico de la producción por continentes en los años 2010, 2011 y 2012

En el ámbito europeo, los países del sur son los que tienen mayores porcentajes en cuanto a producción de tomate (Figura 1.2). En el 2012, con una producción total en Europa de 20.693.590 toneladas de tomate, los países del sur aportaban más de 12 millones de toneladas, más de la mitad. De esos 12 millones de toneladas, encabezaban la lista Italia con 5 millones y España con 4 millones. Otros países destacados eran Grecia y Portugal. (FAOSTAT, 2014).

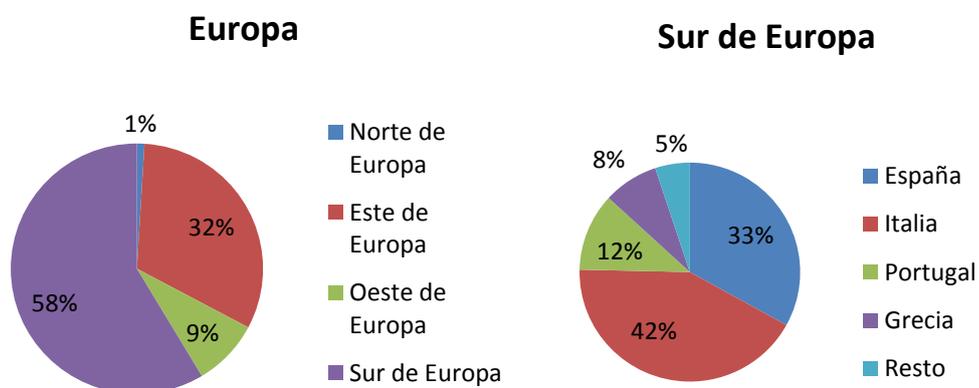


Figura 1.2. Gráfico porcentual de la producción de tomate en 2012 por zonas y por países

1. Introducción

En cuanto a las exportaciones de 2012, España, con 964.054 toneladas de tomate, se situó la tercera a nivel mundial, por detrás de México (1.493.316Tn) y Holanda (1.039.773). Otros países que también exportaron parte de su producción fueron Marruecos, Turquía y Francia. Sin embargo, a pesar de ser los terceros exportadores a nivel mundial, el precio por kilogramos se situó a 0,89€/kg, por los que consiguieron, por ejemplo, Italia (1,67€/kg) o Canadá (1,53€/kg). (FAOSTAT, 2014).

Finalmente, a nivel nacional, España ha sufrido muchos cambios respecto a la producción de tomate. En 2011 produjo 3.864,1 miles de toneladas, pero en 2009 produjo 4.798,1 miles de toneladas (Figura 1.3). También significativo el precio pagado por el tomate español, ya que de pagarse a 32,4 €/100 kg en 2009, pasó a 37€/100 kg en 2010 y a 27,7€/100kg. (MAGRAMA, 2014).

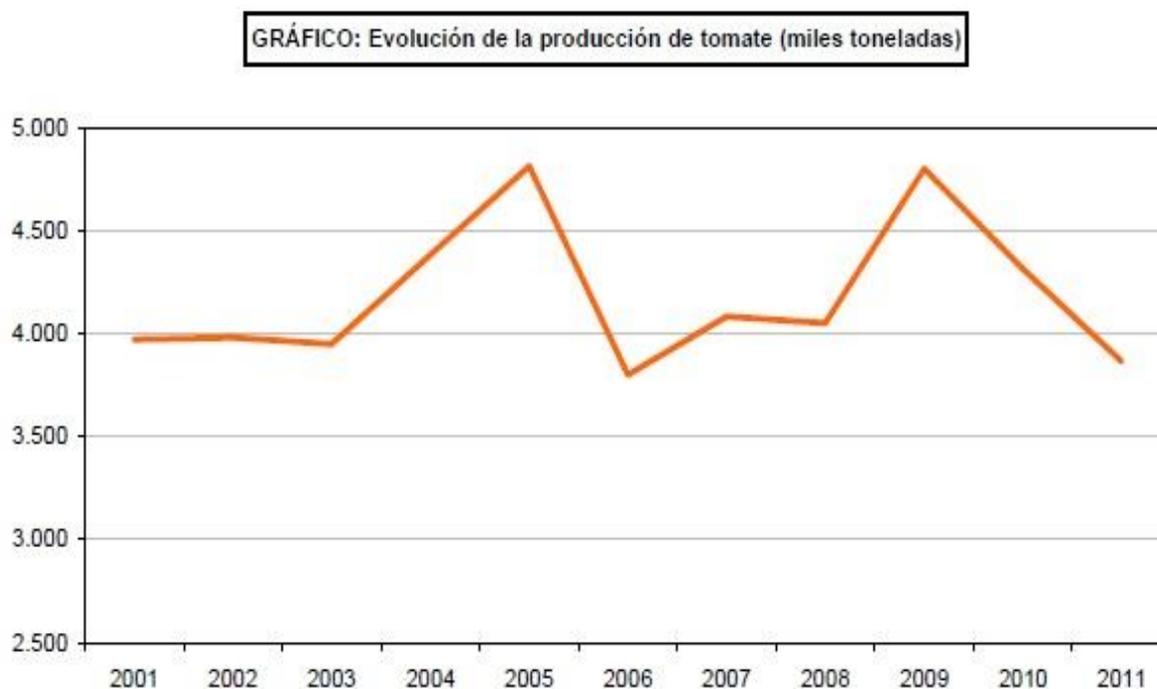


Figura 1.3. Evolución de la producción de tomate en España (miles de toneladas)

Las comunidades españolas con mayores producciones en 2011 (Figura 1.4) fueron Andalucía (1.553.966 Tn) con un 40% sobre el total, Extremadura (1.275.368 Tn) aportaba un 33% de producción y Murcia (311.065 Tn) un 8%. (MAGRAMA 2014).

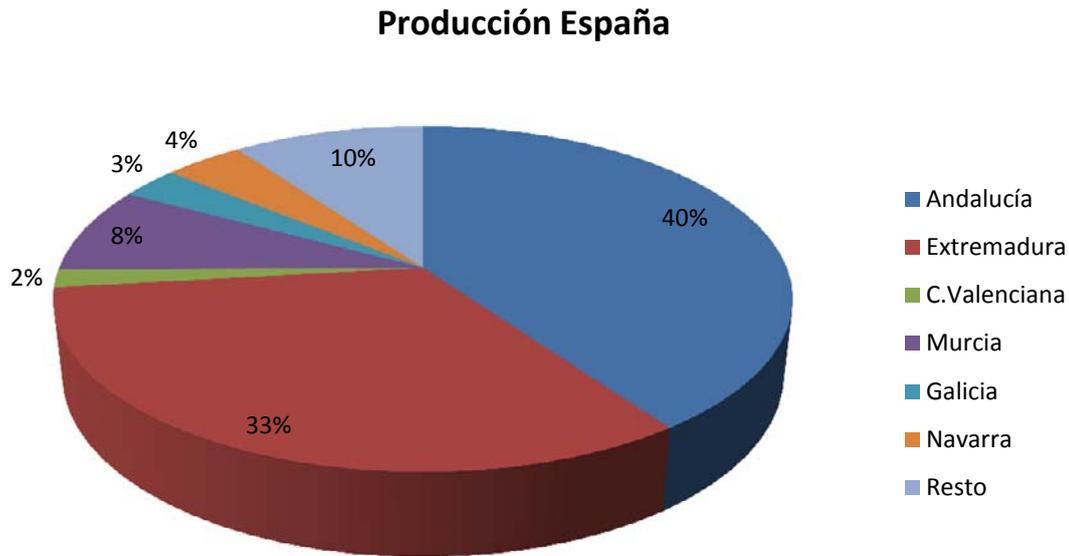


Figura 1.4. Producción de tomate en España por Comunidades Autónomas

1.2. PROGRAMAS DE MEJORA DE TOMATE: ANTECEDENTES Y EVOLUCIÓN

Tradicionalmente, los esfuerzos de los mejoradores de tomate para consumo en fresco se han centrado principalmente en el aumento de la producción, en el tamaño y apariencia del fruto (ausencia de defectos y color atractivo), en la resistencia a enfermedades (como el virus de la cuchara o el virus del bronceado del tomate) y, más recientemente, en la firmeza del fruto y una adecuada longevidad del mismo (“long shelf life tomato”) para transportarlo a largas distancias.

Sin embargo, en la actualidad, los mercados de los países desarrollados como es el caso de los de Europa exigen, junto con otros productos, frutos de tomate con mayor calidad interna. Un objetivo que ha adquirido mucha importancia es la mejora de la calidad organoléptica y nutritiva debido a la creciente demanda de tomates con más sabor y aroma, además de ser más saludables.

Por ello se dice, tal como señalaron Bouma *et al* (1998), que existe una evolución de la agricultura centrada en la cantidad de producción hacia una agricultura centrada, además, en la calidad de la misma. Hoy en día los alimentos con elevada calidad interna lideran el desarrollo de nuevos productos, lo cual es especialmente cierto para

1. Introducción

los alimentos funcionales (“functional foods”), que ofrecen una importante oportunidad de crecimiento a la industria alimentaria (Menrad, 2003).

1.3. CALIDAD FUNCIONAL

La calidad funcional se conoce como el grado de utilidad que poseen los alimentos para satisfacer los requerimientos de las sustancias necesarias que garanticen el buen funcionamiento del organismo humano o animal. Los caracteres funcionales pueden variar dependiendo de la especie, el cultivar, los factores ambientales, las técnicas agrícolas, los tratamientos postcosecha y el almacenaje (Dumas *et al*, 2003)

Los componentes nutricionales del tomate son azúcares y ácidos orgánicos, proteínas y aminoácidos, lípidos, minerales, componentes fenólicos, pigmentos y vitaminas. Estos tres últimos se han identificado especialmente como componentes funcionales. Los componentes funcionales son aquellos que proporcionan beneficios médicos o saludables, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades (Jack, 1995) tal como se comprobará a continuación. De esta manera, el tomate se ha identificado como un alimento funcional (Canene-Adams *et al.*, 2005).

Aunque, en comparación con otros productos agrícolas, el tomate no tiene un gran contenido en vitaminas y antioxidantes (Tabla 1.2), se trata de una hortaliza que es consumida ampliamente durante todo el año; por ejemplo, se muestran cifras de 26,78 y 42,60 kg/habitante año en Europa y España, respectivamente (FAOSTAT, 2014). Además, su consumo es regular y elevado en una gran cantidad de países a lo largo del mundo. Todo ello convierte al tomate en una de las principales fuentes de minerales y antioxidantes (Esquinas-Alcázar and Nuez, 1995) tales como el ácido L-ascórbico o los carotenoides, los cuales protegen frente a enfermedades degenerativas (Mayne, 1996; Beecher, 1998).

Licopeno		Provitamina A		Vitamina C	
Tomate	80-20	Zanahoria	66	Grosella	2200
Guayaba	50	Batata	59	Kiwi	1200
Papaya	50-20	Espinaca	49	Limón	900
Sandía	40	Tomate	5	Coliflor y espinaca	600
Uva	30	Melocotón	5	Naranja	500
Albaricoque	0,05	Naranja	1	Tomate	250

Tabla 1.2. Contenido en vitaminas y antioxidantes de algunas frutas y verduras en $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de peso fresco (Adalid et al, 2004)

1.3.1. Componentes fenólicos

Los principales componentes fenólicos en el tomate son quercetina, naringenina, rutina y ácido clorogénico (Hertog *et al.*, 1992; Clifford, 1999; Paganga *et al.*, 1999; Chassy *et al.*, 2006; Luthria *et al.*, 2006). La concentración de fenoles totales en muestras de tomate varía de 259,15 a 498,60 mg/kg de peso fresco (Martínez-Valverde *et al.*, 2002; Podsedek *et al.*, 2003; Zhou y Yu, 2006). A causa de su estructura, los fenoles son muy eficientes en la lucha contra los radicales peróxido (Halliwell, 1992; Aruoma, 1999). En concreto, los ácidos clorogénicos se han relacionado con propiedades beneficiosas para la salud humana debido a este poder antioxidante, así como hepatoprotector, hipoglucémico y actividad antiviral (Farah y Donangelo, 2006).

El contenido en quercetina (flavonol) depende significativamente de la variedad comercial (Martínez-Valverde *et al.*, 2002), y tiene un promedio medio de 6 mg por kilogramo de peso fresco. Naringenina (flavanone) contiene 7 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (USDA, 2014). Otro componente fenólico principal, el ácido clorogénico, varía desde los 14,31 hasta los 32,84 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, según Martínez-Valverde *et al.*, 2002.

Sin embargo, aun siendo uno de los componentes funcionales de tomate, el contenido en fenoles está directamente relacionado con la astringencia, que es un componente del sabor (Eskin, 1991; Kader, 1992; Seymour *et al.*, 1993). Por tanto, si incrementamos el contenido de fenoles en tomate, podemos alterar el balance interno de estos

1. Introducción

componentes en el fruto y el sabor del tomate podría deteriorarse afectando negativamente a la calidad organoléptica.

1.3.2. Pigmentos

A pesar de que el tomate presenta una baja concentración de pigmentos (0,02 g/100 g peso fresco), estos le aportan un gran valor funcional.

Uno de los principales grupos de pigmentos (rojos, naranjas y amarillos) que se pueden encontrar en este fruto son los carotenoides. El 90-95% de los carotenoides presentes en el tomate maduro son carotenos (Gross, 1991). Dentro de los carotenos, el licopeno es el más abundante en los tomates de color rojo, llegando a representar más del 90% de los carotenoides totales. Un tomate rojo típico contiene niveles más bajos de otros pigmentos como β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno y neurosporeno. También se encuentran pequeñas cantidades de precursores no coloreados como el fitoeno y el fitoflueno. Licopeno y β -caroteno (provitamina A) son los de mayor valor nutricional, y juegan un papel importante en las funciones metabólicas humanas (Rao and Rao, 2007).

Así pues, se ha visto que existe una relación directa entre el consumo de frutas y hortalizas ricas en licopeno y la reducción del riesgo de cáncer y enfermedades vasculares (Clinton, 1998; Dorgan *et al.*, 1998; Bertram y Vine, 2005; Omoni y Aluko, 2005; Tang *et al.*, 2005; Story *et al.*, 2010). El licopeno no solo tiene funciones antioxidantes, sino que participa en la comunicación intercelular y en la modulación del sistema inmune y hormonal (Kun *et al.*, 2006; Shao y Hathcock, 2006). El tomate y sus subproductos (salsas, zumos...) son la principal fuente de licopeno en la dieta occidental (Chung-Ahuja *et al.*, 1993).

Y por lo que respecta al β -caroteno (provitamina A), destaca porque es un nutriente esencial debido a su actividad retinoide y, al igual que otros carotenoides, es un antioxidante que puede proteger del daño de los radicales libres. Su carencia puede producir xerophthalmia, ceguera y muerte prematura (Mayne, 1996), lo cual es un problema nutricional importante en más de 75 países, la mayoría de ellos situados en el mundo en vías de desarrollo (Angosto y Borja, 2001). El papel que el β -caroteno y la

vitamina A desempeñan en el crecimiento, reproducción, mortalidad y morbilidad de enfermedades infecciosas ha sido revisada anteriormente (Tee, 1992; Ross, 1998).

1.3.3. Vitaminas

Las vitaminas son moléculas orgánicas esenciales para el normal crecimiento, desarrollo y reproducción de humanos y animales. Son el tercero de los componentes funcionales del tomate junto con los compuestos fenólicos y los pigmentos anteriormente comentados. El tomate es una fuente interesante de vitaminas para nuestro organismo, principalmente vitamina C (ácido L-ascórbico) y la provitamina A (β -caroteno) (Tabla 1.3).

Vitamina	Contenido ($\mu\text{g}/100\text{ g pf}$)	Funciones principales
Ácido L-ascórbico (vitamina C)	25.000-30.000	Tiene un papel principal en numerosos procesos como la síntesis de neurotransmisores, esteroides y hormonas. Su función antioxidante la relaciona con la prevención de enfermedades degenerativas, ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares.
β-caroteno (provitamina A)	900-1.271 ui*	Protege los epitelios (piel y mucosas). Participa en la visión normal.
Tocoferoles (vitamina E)	40-1.200	Antioxidante natural de los lípidos. Mantiene la permeabilidad de las membranas celulares.
Ácido nicotínico (niacina)	500-700	Participa en el metabolismo de los glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos.
Ácido pantoténico (vitamina B3)	50-750	Necesaria en el metabolismo de hidratos de carbono, grasas y aminoácidos.
Piridoxina (vitamina B6)	80-110	Cofactor de muchas enzimas. Participa en el metabolismo de los aminoácidos y en la transformación del ácido nicotínico.
Tiamina (vitamina B1)	50-60	Interviene en el metabolismo de los carbohidratos y actúa sobre el sistema nervioso.
Riboflavina (vitamina B2)	20-50	Interviene en la respiración celular y en el metabolismo energético.
Ácido fólico	6,4-20	Relacionada con la división celular.
Biotina	1,2-4	Actúa como coenzima.
<i>*ui: unidades internacionales equivalentes a 0,6μg de β-caroteno</i>		

Tabla 1.3. Contenido vitamínico del tomate (Modificado de Davies y Hobson, 1981)

1. Introducción

La función más característica del ácido L-ascórbico ampliamente conocida es como agente antiescorbuto (Magiorkinis *et al.*, 2011). Otra función destacada es su capacidad antioxidante, siendo junto con la vitamina E, el licopeno y el β -caroteno los grandes antioxidantes presentes en la naturaleza. De hecho, la vitamina C funciona como co-antioxidante cuando interactúa con la vitamina E. Por lo que respecta a las enfermedades degenerativas, el ácido L-ascórbico puede jugar un papel clave en el retraso de la patogenicidad de varias de ellas como: enfermedades cardiovasculares (Marchioli *et al.*, 2000; Libby y Aikawa, 2002), ciertos cánceres (Byers y Guerrero, 1995; Girija *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 1997; You *et al.*, 2000; Jamison *et al.*, 2001) y cataratas (Pols-JC y van der Pols, 1998; Tessier *et al.*, 1998; Valero *et al.*, 2002). Sin embargo, la función mejor caracterizada del ácido L-ascórbico es en la síntesis de la proteína de colágeno de tejido conectivo (Phillips *et al.*, 1997; Libby y Aikawa, 2002).

El ácido L-ascórbico también juega un papel importante en la síntesis de hormonas esteroideas, de carnitina (Harmeyer, 2002) y en la degradación de la tirosina. Esta vitamina también puede aumentar la biodisponibilidad del hierro (Nasolodin *et al.*, 1996), prevenir la mutación del ADN inducida por estrés oxidativo (Lutsenko *et al.*, 2002; Collins, 2004), modular la expresión génica y la función celular (con un interés particular en la diferenciación celular) (Duarte y Lunec, 2005).

En 2011, el mercado mundial de alimentos funcionales alcanzó los 33 miles de millones de dólares y la tendencia de los años siguientes fue al alza, debido directamente a la disminución del consumo de una dieta sana y el consecuente aumento de enfermedades relacionadas con la dieta practicada. En España el mercado de los alimentos funcionales representó un volumen de aproximadamente 3000 millones de euros. La demanda comercial y el contenido de constituyentes saludables (compuestos nutraceuticos) del fruto de tomate, hace que el aumento del valor nutricional de esta hortaliza se convierta en un objetivo importante, ya sea mediante mejora tradicional o por manipulación genética.

Además, cabe destacar que el aumento de carotenoides y vitaminas en la dieta es más efectivo que el uso de suplementos vitamínicos, ya que otros nutrientes en los productos alimenticios pueden actuar sinérgicamente con los carotenoides y vitaminas (Romer *et al.*, 2005; Stacewicz-Sapuntzakis y Bowen, 2005). De hecho, se ha

demostrado en varios ensayos clínicos con altas dosis de un solo componente (como el β -caroteno) cuyos resultados han sido decepcionantes (Hennekens *et al.*, 1994; Omenn *et al.*, 1996; Rapola *et al.*, 1997; Anónimo, 1998; Russell *et al.*, 1999; Demmig-Adams y Adams, 2002; Barret, 2003; Bendich, 2004; Dulinska *et al.*, 2005). Además, los antioxidantes sintéticos requieren ensayos extensos y caros para determinar su seguridad alimentaria, haciéndose adecuado el uso de antioxidantes naturales (Frankel, 1995). En 2003, la *U.S. Preventive Services Task Force* (USPSTF) concluyó que no hay suficientes evidencias científicas para recomendar suplementos vitamínicos como forma de prevenir el cáncer o enfermedades cardíacas.

Así pues, la recomendación más prudente y científicamente respaldada para la población general es consumir una dieta equilibrada, poniendo énfasis en frutas y hortalizas ricas en componentes funcionales, y cereales. Aunque algunos productos sintéticos contienen cantidades significativas de nutrientes, estos últimos pueden ser obtenidos fácilmente de nuestros alimentos a un bajo coste (Anónimo, 1995; Bouis, 2003).

Actualmente, hay muchas posibilidades de aplicar este concepto con éxito en tomate, ya que es posible aumentar los compuestos funcionales (principalmente licopeno, β -caroteno y vitamina C) sin afectar negativamente su sabor. No obstante, son necesarios los conocimientos de las rutas biosintéticas, el control genético, la influencia de los factores ambientales y las prácticas culturales que influyen en la acumulación de carotenoides y vitaminas en el fruto para llevar a cabo con éxito un programa de mejora de su calidad nutritiva y funcional.

En este trabajo nos ocuparemos únicamente de la evaluación del contenido de ácido L-ascórbico acumulado en frutos a fin de aumentar la calidad nutricional del tomate en programas de mejora, por tanto, en el resto de la introducción vamos a centrarnos en aspectos relacionados con la mejora del contenido de esta vitamina en tomate.

1. Introducción

1.4. BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO L-ASCÓRBICO EN PLANTAS

El ácido L-ascórbico, también conocido como vitamina C (figura 1.5), es un monosacárido (azúcar ácido) hidrosoluble presente en las células de las plantas. Este ácido es uno de los más importantes antioxidantes, además de ser un regulador del crecimiento y cofactor enzimático para las plantas.

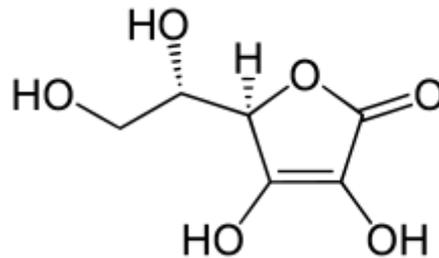


Figura 1.5. Estructura molecular del ácido L-ascórbico (www.chemheritage.org)

El ácido L-ascórbico realiza un papel importante en muchos procesos biológicos, incluidos los mecanismos de defensa, la fotosíntesis, la división celular, la regulación del crecimiento, y la senescencia (Alós, E. *et al.*, 2013). También desempeña la función de dador de electrones para enzimas redox. (Bartoli *et al.*, 2000; Millar *et al.*, 2003).

El estudio de las rutas biosintéticas del ácido L-ascórbico ha dado un paso muy importante en las últimas dos décadas. Ya a principios del siglo XX, esta pequeña molécula fue caracterizada a partir de los tejidos de la planta. Sin embargo, el primer hito importante en el conocimiento de la biosíntesis de la vitamina C no se consiguió hasta finales de del siglo pasado, cuando Wheeler *et al.* (1998) describen ruta de la L-galactosa. Desde este estudio, amplias investigaciones se han hecho para identificar y caracterizar las rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis de la vitamina C en diferentes especies de plantas, y en la actualidad, hay un consenso generalizado acerca de la existencia de cuatro vías interconectadas (figura 1.6) que de alguna manera están involucradas en la biosíntesis de la vitamina. Estas vías metabólicas han sido nombradas de acuerdo con las moléculas que actúan como precursoras: L-galactosa, L-gulosa, myo-inositol y el galacturonato (Agius *et al.* 2003; Lorence *et al.* 2004; Maruta *et al.* 2010; Wheeler *et al.* 1998; Wolucka and Van Montagu 2003.)

Entre estas vías, la vía de la L-galactosa es considerada como la predominante. Ésta consiste en una serie de sucesivas reacciones, a partir de la D-manosa-1-fosfato, y siendo GDP-L-galactosa y L-galactona-1,4-lactona los intermediarios de la formación de la vitamina C. (Zhang, Y. et al, 2013).

Adicionalmente, se ha demostrado recientemente que, además de la formación de GDP-L-galactosa, la enzima GDP-D-manosa-3,5-epimera (GME) también puede producir GDP-L-gulosa. Esta observación dio lugar a la propuesta de una ruta alternativa (L-gulosa) en la que L-gulosa y L-gulono-1,4-lactona eran intermediarios clave (Zhang, Y. et al, 2013).

Por otra parte, el descubrimiento de un gen en *Arabidopsis* que codificaba para la oxigenasa myo-inositol sugirió otra ruta alternativa para la L-gulono-1,4-lactona (vía myo-inositol). Finalmente, la cuarta y última ruta en plantas usa el ácido D-galacturónico como el precursor a converger en la formación del intermediario L-galactone-1,4-lactona. (Alós, E. et al, 2013).

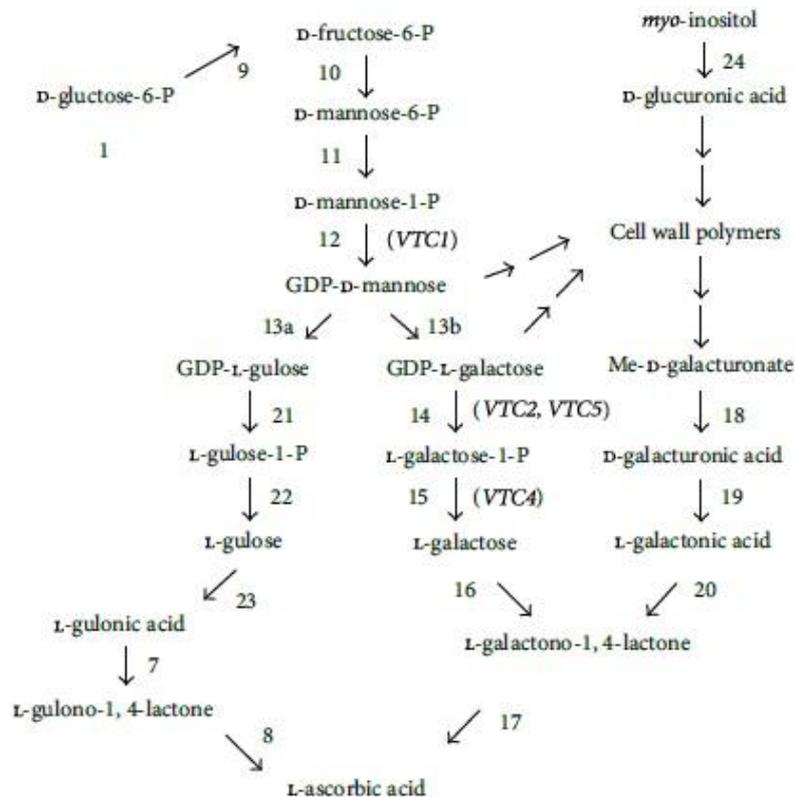


Figura 1.6. Rutas biosintéticas del ácido L-ascórbico en plantas (Agius, F. et al, 2003). Las enzimas en cada ruta son, 1: fosfoglucomutasa; 7: gluconolactonasa; 8: gulono-1,4-lactona deshidrogenasa; 9: glucosa-6-fosfato isomerasa; 10: manosa-6-fosfato isomerasa; 11:

1. Introducción

fosfomanosa mutasa; 12: GDP-manosa pirofosforilasa; 13: GDP-manosa-3,5-epimerasa; 14: GDP-L-galactosa fosforilasa; 15: L-galactosa-1-fosfato fosfatasa; 16: L-galactosa deshidrogenasa; 17: L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa; 18: metilesterasa; 19: D-galacturonato reductasa; 20: aldonolactonasa; 21: fosfodiesterasa; 22: sugar-phosphatase; 23: L-gulosa deshidrogenasa; 24: myo-inositol oxigenasa.

Además de las rutas señaladas, otros procesos como la degradación y el reciclaje han demostrado que pueden ser determinantes en la regulación de las concentraciones endógenas de vitamina C en las células de la planta (Figura 1.7).

En las plantas, el ácido L-ascórbico se puede transformar en monodeshidroascorbato (MDHA) por las enzimas degradantes ascorbato oxidasas (AO) y la ascorbato peroxidasa (APX). Por el contrario, la reductasa de monodeshidroascorbato (MDHAR) y reductasa deshidroascorbato (DHAR) participan en el reciclaje de la MDHA y deshidroascorbato, respectivamente, para generar vitamina C.

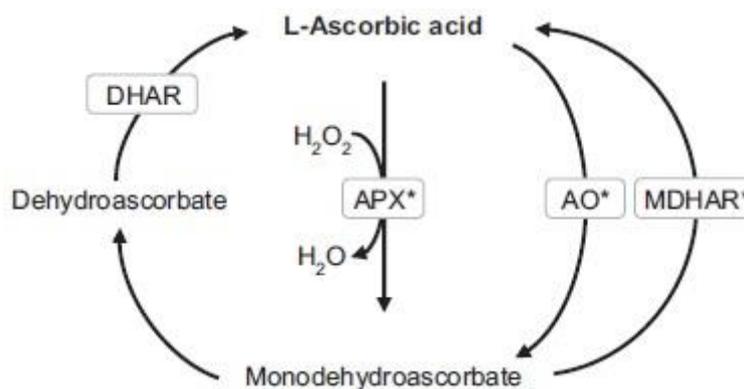


Figura 1.7. Esquema de las rutas de reciclaje del ácido L-ascórbico (Alós, E. et al, 2013).

Todo esto parece ser la base para estudiar más a fondo como interrelacionan estas vías de biosíntesis del ácido L-ascórbico y sus posibles interacciones con otros procesos metabólicos que tienen lugar dentro de la célula (Conklin et al., 2006). Un campo todavía en gran parte inexplorado es como se regula la acumulación de la vitamina. Recientes estudios (Zhang et al, 2013) demuestran que la acumulación de ácido L-ascórbico en tomates se asocia con la transducción de señal de luz.

1.5. PERSPECTIVAS DE MEJORA DEL VALOR FUNCIONAL DEL TOMATE AUMENTANDO EL CONTENIDO DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO

1.5.1. Cuantificación rápida y precisa de ácido L-ascórbico

En muchos estudios dentro de la mejora y el control de la calidad de frutas y hortalizas, el análisis químico de un gran número de muestras puede llegar a ser un factor limitante. Por tanto, es muy importante el uso de técnicas analíticas rápidas y precisas. Las vitaminas pueden ser cuantificadas por protocolos enzimáticos (Lee *et al.*, 1991; Rumsey y Levine, 2000) y HPLC (Rizzolo y Polesello, 1992; Hart y Scott, 1995). En el grupo de Mejora de la Calidad Agroalimentaria de la UJI se ha elegido la electroforesis capilar (CE) por ser una técnica analítica que ofrece un alto poder resolutorio, una mínima preparación de la muestra, un tiempo de análisis corto y un coste operacional bajo (Galiana-Balaguer *et al.*, 2001).

1.5.2. Uso de transgénesis

El contenido de vitamina C está influenciado no sólo por su biosíntesis, sino también por su reciclaje (Figura 1.7). Si lo combinamos con la posibilidad de la existencia de múltiples rutas biosintéticas, esto hace que sea muy difícil predecir y modificar su contenido. Los trabajos publicados se dividen básicamente en tres propuestas: sobreexpresión de las enzimas biosintéticas (Figura 1.6), sobreexpresión de enzimas de reciclado (dehidroascorbato reductasa, DHAR) y supresión antisentido de la ascorbato oxidasa (AO). AO es una enzima apoplástica que afecta el estado redox del ascorbato extracelular (Pignocchi y Foyer, 2003; Sanmartin *et al.*, 2003).

Como casos prácticos nos encontramos el de Jain y Nessler (2000) que introdujeron con éxito un cADN codificando L-gulono-1,4-lactona oxidasa (GLO) en tabaco transgénico y plantas de lechuga. La concentración de ácido L-ascórbico en hojas se incrementó de 4 a 7 veces en estos dos cultivos. Tokunaga *et al.* (2005) sobreexpresaron la enzima L-galactona-1,4-lactona deshidrogenasa aumentando el contenido de vitamina C en plantas transgénicas de tabaco. En fresa, también se aumentó de 2 a 3 veces el contenido de vitamina C sobreexpresionando la ácido galacturónico reductasa (Agius *et al.*, 2003). Chen *et al.* (2003) demostraron que el

1. Introducción

contenido de vitamina C en plantas puede ser incrementado aumentando la expresión del enzima responsable del reciclaje del ascorbato (DHAR). El incremento en la expresión del DHAR aumentó los niveles de ácido L-ascórbico foliar y del grano de 2 a 4 veces, y aumentó significativamente el estado redox del ascorbato en tabaco y en maíz. Estos trabajos sugieren la posibilidad de trasladar las técnicas aplicadas para aumentar el contenido de ácido L-ascórbico a otros cultivos (Hancock y Viola, 2005). En tomate transgénico, disminuyeron la actividad de la malato deshidrogenasa, consiguiendo un efecto positivo en la capacidad de uso de la L-galactona-1,4-lactona, el precursor terminal de la biosíntesis del ácido L-ascórbico (Nunes-Nesi *et al.*, 2005).

1.5.3. Uso de la variabilidad presente en germoplasma de tomate y especies relacionadas

La otra forma de incrementar el contenido de ácido L-ascórbico y carotenoides en tomate es el uso de germoplasma del género *Solanum* con un alto contenido de ácido L-ascórbico como parental donante en programas de mejora. Para llevar a cabo esta estrategia, se necesitan fuentes de variabilidad con elevado contenido en este antioxidante.

En concreto, los niveles de vitamina C varían considerablemente con las especies de tomate, desde 80 mg/kg de peso fresco en variedades cultivadas hasta 1.190 mg/kg de peso fresco en especies silvestres como *Solanum peruvianum* (Stevens y Rick, 1986), o 1.113 mg/kg de peso fresco en *S. pimpinellifolium* (Galiana-Balaguer *et al.*, 2001). Un rango de variación entre 100 hasta 480 mg/kg de peso fresco de vitamina C se puede observar comúnmente en distintos cultivares de tomate (Abushita *et al.*, 1997; Abushita *et al.*, 2000; Hagimori *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2010; Chandra y Ramalingan, 2011).

Se han encontrado varias fuentes de variabilidad muy interesantes por su alto contenido de vitamina C. Entre las especies de *Solanum*, *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* var *cerasiforme* parecen ser las de más interés, ya que son las más próximas filogenéticamente a la especie cultivada, y esto permite una rápida recuperación de los caracteres agronómicos interesantes (Hanson *et al.*, 2004; Lenucci *et al.*, 2006). En varios ensayos de cribado de la colección de germoplasma de *Solanum*

del COMAV y en los que el grupo de Mejora de la Calidad Agroalimentaria de la UJI ha colaborado, se han caracterizado entradas de *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* var *cerasiforme* con contenidos en vitamina C entre 1,6 y 8 veces mayores que en los controles de *S. lycopersicum* (Roselló *et al.*, 2000a, 2000b; Galiana-Balaguer *et al.*, 2001; Adalid *et al.*, 2008), lo que podría ser muy útil en programas de mejora.

1.5.3.1. Influencia del ambiente de cultivo

No todo el material vegetal de tomate y sus especies relacionadas responden igual frente a diferentes ambientes. Así pues, otro aspecto importante a considerar en los programas de mejora del valor funcional en tomate, es la influencia del medio en la expresión del carácter deseado (en nuestro caso ácido L-ascórbico). Esta influencia determina la heredabilidad y el éxito de la selección en los programas de mejora.

Se ha visto que la localidad y el ciclo de cultivo, junto a la desigual respuesta de las diferentes variedades cultivadas a ambos (fuerte interacción Genotipo × Ambiente) (Giuntini *et al.*, 2005) y los factores agronómicos influyen en el contenido de antioxidantes (García y Barrett, 2006; Kumar *et al.*, 2007; Aldrich *et al.*, 2010).

Por lo que respecta al contenido de ácido L-ascórbico en tomate, los factores del ambiente que afectan de manera significativa a la acumulación de esta vitamina son temperatura y radiación. Los factores agronómicos que influyen son la disponibilidad hídrica, la fertilización, la actividad de reguladores de crecimiento, el estado de madurez del fruto y el tiempo de almacenaje en postcosecha junto con los tratamientos que allí se llevan a cabo.

En lo que se refiere a factores ambientales, se ha constatado que existe una correlación directa del contenido de ácido L-ascórbico con las variaciones de temperatura (Liptay *et al.*, 1986), sin embargo en otros ensayos no se vio una correlación clara (Lee y Kader, 2000; Raffo *et al.*, 2006). A su vez, la exposición a la luz favorece la acumulación de vitamina C en frutos de tomate (Hamner *et al.*, 1945; Somers *et al.*, 1951; Venter, 1977; López-Andreu *et al.*, 1986; El-Gizawy *et al.*, 1993), pero puede disminuir si los tejidos del fruto se exponen directamente a la radiación (650 W/m² de una lámpara incandescente) (Adegoroye y Jolliffe, 1987; Rosales *et al.*, 2006). Además, se ha visto que las condiciones de estrés a las que esté sometida la

1. Introducción

planta, puede variar la expresión de los genes responsables de la acumulación de ácido L-ascórbico (Ioannidi *et al.*, 2009).

En cuanto a los factores agronómicos, los efectos de la disponibilidad hídrica, de los nutrientes minerales (nitrógeno, fósforo, potasio o calcio) y de los reguladores del crecimiento han sido estudiados también, pero los resultados han sido, al igual que con los factores ambientales, de manera general contradictorios y los datos a menudo incompletos (Rosenfeld, 1999; Lee y Kader, 2000; Munne y Alegre, 2000; Dumas *et al.*, 2003; Oke *et al.*, 2005; Fanasca *et al.*, 2006; Thyboa *et al.*, 2006; Toora *et al.*, 2006; Serio *et al.*, 2007; Taber *et al.*, 2008). Los efectos de estado de madurez del fruto y tiempo de almacenamiento en postcosecha se muestran en la siguiente tabla (Tabla 1.4), donde se observa como aumenta el contenido de ácido L-ascórbico a la vez que madura el fruto y como se reduce cuanto más tiempo pasa almacenado.

Tratamiento	Estado de madurez	Contenido de ácido L-ascórbico en peso fresco (mg·Kg ⁻¹)	
Cosecha inicial	Verde inmaduro	140 ± 5,1	
	Verde maduro	150 ± 6,9	
	Rosa	154 ± 4,5	
	Rojo maduro	162 ± 6,4	
	Sobremaduro	166 ± 9,1	
Almacenado a:			
65 °F	1 semana	Rojo maduro	145 ± 21,1
	2 semanas	Rojo maduro	150 ± 17,8
	3 semanas	Rojo maduro	85 ± 3,9
70 °F	1 semana	Rojo maduro	144 ± 13,5
	2 semanas	Rojo maduro	129 ± 6,6
	3 semanas	Rojo maduro	82 ± 7,5

Tabla 1.4. Contenido de ácido L-ascórbico en frutos de tomate a diferentes estados de madurez y temperaturas de almacenamiento (adaptada de Hamner *et al.*, 1945)

Se puede concluir, a la vista de la disparidad de los datos obtenidos en los estudios citados, que la gran influencia que ejercen las variables ambientales y agronómicas en la expresión de ácido L-ascórbico, y de otros compuestos nutraceuticos, en frutos de tomate todavía tiene que ser determinada.

Para realizar una adecuada evaluación del material vegetal candidato a ser usado en programas de mejora se hace necesario fijar las condiciones agronómicas de cultivo (sustratos, riego, fertilización...) pero es imposible hacer lo mismo con los factores ambientales (temperatura y radiación), sobretodo en cultivo no protegido, los cuales

varían significativamente dependiendo del ciclo y de la localización. Y no sólo el Ambiente (E) juega un papel importante, sino que se ha sugerido que la interacción Genotipo × Ambiente (G×E) puede ser notable. Por lo tanto, deberían llevarse a cabo más estudios sobre la contribución de diferentes Ambientes (E_j), Genotipos (G_i) y de sus interacciones ($G_i \times E_j$) sobre la expresión de caracteres funcionales, en nuestro caso ácido L-ascórbico, con el fin de averiguar cuánto enmascara E el potencial genotípico (G) de expresión del carácter. Así se podrán seleccionar genotipos de élite con más precisión que aumenten la acumulación de este componente favorable. La información sobre la naturaleza de las interacciones G×E es particularmente necesaria para determinar si es posible desarrollar variedades de elevados contenidos de caracteres nutricionales con gran estabilidad ambiental u otras de específicas para determinados ambientes.

1.5.3.2. Control genético

Conocer el control genético de los caracteres nutraceuticos que más nos interesan es necesario para poder manejarlos eficientemente en los programas de mejora de tomate. Pero de momento no existen suficientes conocimientos sobre el control genético de estos caracteres en tomate. Algunos autores indican que muchos de estos caracteres son cuantitativos, con una heredabilidad pobre y con control poligénico (Khan *et al.*, 1999).

Daskaloff *et al.* (1981) encontró dominancia para alto contenido de ácido L-ascórbico, mientras que Bhatt *et al.*, (1998, 2001) encontró cierto grado de heterosis entre diversos cultivares de *S. lycopersicum* (efectos heteróticos positivos alrededor de 50-60 % respecto a los padres) que pueden resultar interesantes para el desarrollo de híbridos comerciales. La magnitud de la varianza debida tanto a la capacidad combinatoria específica como general fue altamente significativa, indicando la importancia de acciones génicas aditivas y no aditivas de este carácter. Garg *et al.* (2008) mostró que la varianza genética no aditiva predominó en controlar el contenido del ácido L-ascórbico. Otros autores han encontrado segregaciones transgresivas para el carácter contenido en ácido L-ascórbico (Rousseaux *et al.*, 2005). Causse *et al.* (2003) estudió el control genético de la calidad de tomate para consumo en fresco analizando atributos de calidad en 45 híbridos y sus 13 líneas parentales, cultivadas en

1. Introducción

dos ambientes contrastados. Concluyeron que el ácido L-ascórbico fue heredado de una manera aditiva. Recientes estudios han intentado identificar genes candidatos que afecten el contenido de ácido L-ascórbico en tomate (Stevens *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2006), encontrando QTLs comunes para varias especies de tomate, aunque se necesitaría un mapeado más fino para comprobar si los genes identificados son responsables de los QTLs observados.

Resumiendo, no se pueden obtener conclusiones definitivas sobre el control genético de los nutraceuticos en tomate con los trabajos realizados hoy en día. Los resultados son dispersos dependiendo del material vegetal utilizado. Además, el efecto de la localidad, del ciclo de cultivo y del estado de maduración del fruto tienen influencia en el contenido de carotenoides y vitaminas (Garcia and Barret, 2006). Por tanto, se requieren más estudios sobre el control genético de la acumulación de nutraceuticos en tomate y de la influencia del medio.

1.5.3.3. Marcadores moleculares

Con el ambiente caracterizado y una cuantificación precisa de los componentes nutricionales, se pueden buscar marcadores moleculares para aumentar la velocidad del proceso de selección. Debido a los avances en el estudio de las rutas biosintéticas se pueden encontrar trabajos en los que se han mapeado genes directamente relacionados con el contenido de antioxidantes de tomate (Zou *et al.*, 2006), conocimientos que pueden ser utilizados para el desarrollo de marcadores moleculares altamente ligados al carácter en cuestión. De todos modos, aún se está lejos de relacionar secuencia con fenotipo. También se puede usar la información obtenida de los QTL para el desarrollo de marcadores (Causse *et al.*, 2002; Stevens *et al.*, 2007).

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo de investigación es realizar un cribado de germoplasma de tomate y especies silvestres relacionadas en diferentes ambientes con la finalidad de explicar la contribución relativa del genotipo, del ambiente de crecimiento y de la interacción de ambos a la expresión fenotípica del contenido en ácido L-ascórbico. A partir de esa información se podrá establecer el potencial genotípico real de esos materiales para su posible uso directo o como fuentes de variabilidad en programas de mejora del contenido en ácido L-ascórbico en tomate.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Se estudiaron 27 entradas de diferentes orígenes con diferentes características de fruto (Tabla 3.1). Cuatro de estas entradas pertenecen a *Solanum neorickii*, dieciocho a *S. pimpinellifolium*, dos a *S. chmielewski*, dos a *Solanum lycopersicum* y una a *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*.

Entradas	Especie	Entradas	Especie
UJI001	<i>S. pimpinellifolium</i>	UJI015	<i>S. pimpinellifolium</i>
UJI002	<i>S. pimpinellifolium</i>	UJI016	<i>S. pimpinellifolium</i>
UJI003	<i>S. pimpinellifolium</i>	UJI017	<i>S. pimpinellifolium</i>
UJI004	<i>S. pimpinellifolium</i>	UJI018	<i>S. pimpinellifolium</i>
UJI005	<i>S. pimpinellifolium</i>	UJI019	<i>S. neorickii</i>
UJI006	<i>S. pimpinellifolium</i>	UJI020	<i>S. neorickii</i>
UJI007	<i>S. pimpinellifolium</i>	UJI021	<i>S. neorickii</i>
UJI008	<i>S. pimpinellifolium</i>	UJI022	<i>S. neorickii</i>
UJI009	<i>S. pimpinellifolium</i>	UJI023	<i>S. chmielewski</i>
UJI010	<i>S. pimpinellifolium</i>	UJI024	<i>S. chmielewski</i>
UJI011	<i>S. pimpinellifolium</i>	FORTUNA - C	<i>Solanum lycopersicum</i>
UJI012	<i>S. pimpinellifolium</i>	UJI026	<i>Solanum lycopersicum</i>
UJI013	<i>S. pimpinellifolium</i>	UJI027	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>
UJI014	<i>S. pimpinellifolium</i>		
Remarcadas en negrita las entradas control			

Tabla 3.1. Características de las entradas evaluadas

Todas estas entradas estudiadas se han obtenido a partir de la colección de semillas de tomate de la Universitat Jaume I de Castellón de la Plana.

En cuanto a los controles, se utilizaron tres entradas: FORTUNA-C, UJI026 y UJI027. Los dos primeros controles, con contenidos medio-bajos de ácido L-ascórbico, han sido utilizados frecuentemente como controles en ensayos anteriores. Finalmente, el control UJI027, de la especie *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*, se usó como

control porque mostró, en ensayos anteriores, contenidos muy elevados de ácido L-ascórbico (Leiva-Brondo *et al*, 2012).

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

Los ensayos fueron llevados a cabo en dos ambientes de crecimiento que representan ciclos y técnicas de cultivo comunes. En Castellón en el ensayo al aire libre (Foto 3.1) y en Valencia en invernadero (Foto 3.2) se utilizó un diseño de bloques al azar, con tres bloques por ambiente, 27 parcelas elementales por bloque (una por cada entrada) y 3 plantas en cada parcela elemental.



Imagen 3.1. *Ensayo en Castellón al aire libre. Parcela experimental de la UJI*



Imagen 3.2. *Ensayo en Valencia en invernadero*

3. Materiales y métodos

Se utilizaron dos localidades y dos ambientes de cultivo en ciclo de primavera-verano. En Castellón (39º 59'N, 0º2'W, 35m s. n. m.) el cultivo se realizó al aire libre en la parcela experimental que tiene la UJI. En Valencia (39º 28'N, 0º22'W, 15 m s. n. m.) el cultivo se llevó a cabo en un invernadero de cristal. En el ambiente de cultivo protegido se utilizaron sistemas de disipación de calor (sombreo progresivo y uso de cooling o aire acondicionado). Las plantas fueron trasplantadas, entutoradas y cultivadas (Imagen 3.3) siguiendo las operaciones habituales para este cultivo. Todas ellas, en el ensayo al aire libre, fueron llevadas a cabo por el grupo de Mejora de la Calidad Agroalimentaria de la Universitat Jaume I.



Imagen 3.3. Imagen de las plantas tras el trasplante a campo, entutoradas con cañas. Arriba-izquierda: herramienta de cinta para atar las plantas a la caña. Abajo-derecha: herramienta para pinchar la tubería y montar los emisores.

La fertirrigación se programó diariamente, utilizando la siguiente disolución nutritiva (meq/L): 4.0 Mg^{2+} , 1.96 Na^+ , 8.0 K^+ , 8.5 Ca^{2+} , 1.0 NH_4^+ , 2.25 Cl^- , 11.86 NO_3^- , $1.5 \text{ H}_2\text{PO}_4^{2-}$ y 0.5 HCO_3^- . Se utilizó una mezcla comercial de micronutrientes (Nutrel C, Phosyn, Saen) con la siguiente composición (mM): 0.76 Cu , 20.15 Fe , 9.01 Mn , 1.38 Zn , 9.71 B , y 0.31 Mo . La EC se fijó en 2.35 dS/m y el pH en 5.5 unidades.

3.3. MUESTREO Y PROCESADO DE LA MUESTRA

Fueron cosechados frutos de madurez uniforme y sana en el estadio de rojo maduro (Imagen 3.4). Las entradas con colores distintos del rojo se cosecharon cuando los frutos alcanzaron la máxima intensidad de color. Se recogieron un total de 5-20 frutos (dependiendo de las especies) representativos de cada planta sólo de los tres primeros racimos para minimizar la intravariabilidad de la planta. Se emplearon cuatro homogeneizadores (KRUPS Power XL6) para triturar la muestra (Imagen 3.5). Una vez trituradas y etiquetadas las muestras (Imagen 3.6) se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis (Imagen 3.7).



Imagen 3.4. Frutos de *Solanum lycopersicum* muestreados en estadio de rojo maduro.



Imagen 3.5. Conjunto de trituradoras utilizadas para procesar la muestra y prepararla para almacenarla a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Imagen 3.6. Caja llena de microtubos. Arriba-izquierda: microtubo de centrifugación con muestra triturada



Imagen 3.7. Cajas llenas de microtubos almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4. DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO L-ASCÓRBICO

El ácido L-ascórbico se cuantificó por electroforesis capilar zonal (CZE) (Roselló *et al*, 2002) empleando un equipo P/ACE MDQ (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA)

3. Materiales y métodos

(Imagen 3.8). Se descongelaron en la oscuridad dos gramos de muestra a 4 °C y se centrifugaron a 12500 rpm en una centrífuga refrigerada. El sobrenadante fue diluido en 2% de ácido metafosfórico para evitar la oxidación del ácido L-ascórbico. Se usó ácido benzoico como patrón interno. Los extractos de las muestras se filtraron a través de filtros de membrana de 0.2 µm (Millipore, Bedford, MA, USA) antes de la inyección. Se usaron capilares recubiertos con gel de sílice fundida (31.2 cm de longitud total, 21 cm de longitud efectiva, 50 µm de diámetro interno) (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) (Figura 3.1). La inyección hidrodinámica de las muestras se llevó a cabo a 0.5 psi durante 5s. La longitud de onda de detección fue 254 nm. La separación (Figura 3.2) fue realizada a -15 kV y 25 °C. Se realizaron tres repeticiones por muestra.



Imagen 3.8. Equipo de CZE utilizado para el análisis de muestras.

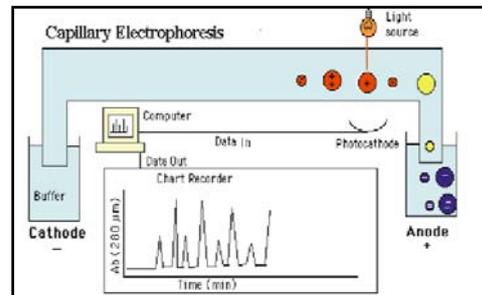


Figura 3.1. Esquema de la migración de moléculas en un equipo de electroforesis capilar.

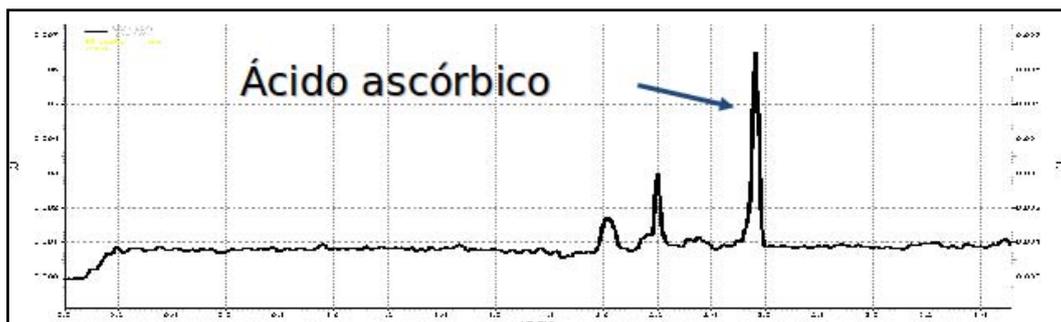


Figura 3.2. Electroferograma donde se observa la separación del pico de ácido L-ascórbico en una muestra de tomate.

3.5. ANÁLISIS DE DATOS

El modelo lineal mixto empleado para el análisis del genotipo i en el ambiente j y bloque k dentro del ambiente j fue:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + E_j + GE_{ij} + B_{k(j)} + e_{ijk}$$

donde Y = valor fenotípico con media poblacional μ y varianza V_p ; G = efecto del genotipo con media 0 y varianza V_G ; E = efecto ambiental con media 0 y varianza V_E ; GE = efecto de la interacción genotipo \times ambiente con media 0 y varianza $V_{G \times E}$; B = el efecto del bloque con media 0 y varianza V_B ; e = efecto residual con media 0 y varianza V_e . Todos los factores son considerados como aleatorios. Se usó el método MINQUE (1) para obtener la estima de los componentes varianza y covarianza para cada efecto. La estima de la varianza y covarianza se usó para calcular los coeficientes de correlación correspondientes para los efectos fenotípicos, genotípicos, ambientales y de interacción. Los factores aleatorios se predijeron empleando el método AUP (Adjusted Unbiased Prediction) (Zhu y Weir, 1996).

Los errores estándar de las estadísticas se obtuvieron por procedimientos jackknife (Miller, 1974; Zhu i Weir, 1996) y se realizaron tests t de dos colas para comprobar la significancia de los parámetros obtenidos. Se recalculó también el modelo considerando el ambiente como un factor fijo para la estación de crecimiento y el tipo de cultivo. En este caso la comparación de medias se realizó con test LSD ($\alpha = 0.05$).

Todos los análisis de datos fueron realizados con el programa QGASStation (v. 1) (Bioinformatics Institute, Zhejiang University, China).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. MEDIAS FENOTÍPICAS DE LOS CONTENIDOS DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO EN LAS ENTRADAS ESTUDIADAS

Los resultados obtenidos muestran una amplia variabilidad para la acumulación de vitamina C entre entradas e incluso dentro de alguna de ellas (Tabla 4.1).

Entradas	Especies	Ambientes	
		CSal	VLCi
UJI001	<i>S. pimpinellifolium</i>	661,4 ± 70,5	488,3 ± 103,2
UJI002	<i>S. pimpinellifolium</i>	421,5 ± 21,0	380,8 ± 39,5
UJI003	<i>S. pimpinellifolium</i>	381,9 ± 48,3	219,7 ± 35,6
UJI004	<i>S. pimpinellifolium</i>	337,6 ± 34,1	193,7 ± 30,4
UJI005	<i>S. pimpinellifolium</i>	416,4 ± 49,4	127,4 ± 18,3
UJI006	<i>S. pimpinellifolium</i>	610,6 ± 100,1	69,5 ± 17,9
UJI007	<i>S. pimpinellifolium</i>	605,4 ± 47,6	258,9 ± 50,5
UJI008	<i>S. pimpinellifolium</i>	945,2 ± 84,0	318,0 ± 51,4
UJI009	<i>S. pimpinellifolium</i>	1056,9 ± 76,2	679,6 ± 108,6
UJI010	<i>S. pimpinellifolium</i>	277,1 ± 20,6	247,7 ± 24,6
UJI011	<i>S. pimpinellifolium</i>	293,7 ± 18,3	248,3 ± 30,4
UJI012	<i>S. pimpinellifolium</i>	341,8 ± 26,1	525,9 ± 72,1
UJI013	<i>S. pimpinellifolium</i>	347, 2 ± 19,0	235,8 ± 31,1
UJI014	<i>S. pimpinellifolium</i>	277, 8 ± 15,3	309,5 ± 30,4
UJI015	<i>S. pimpinellifolium</i>	842,2 ± 70,1	415,8 ± 83,5
UJI016	<i>S. pimpinellifolium</i>	830,7 ± 62,0	446,1 ± 69,4
UJI017	<i>S. pimpinellifolium</i>	413,0 ± 29,7	110,6 ± 12,9
UJI018	<i>S. pimpinellifolium</i>	570,1 ± 41,6	122,1 ± 20,8
UJI019	<i>S. neorickii</i>	276,4 ± 12,4	115,7 ± 14,3
UJI020	<i>S. neorickii</i>	351,5 ± 17,3	216,4 ± 62,7
UJI021	<i>S. neorickii</i>	360,4 ± 19,2	357,6 ± 87,3
UJI022	<i>S. neorickii</i>	265,5 ± 17,9	185,6 ± 41,2
UJI023	<i>S. chmielewskii</i>	360,9 ± 113,4	581 ± 2,9
UJI024	<i>S. chmielewskii</i>	281,9 ± 17,43	60,6 ± 7,1
FORTUNA-C	<i>S. lycopersicum</i>	111,8 ± 4,1	92,6 ± 30,2
UJI026	<i>S. lycopersicum</i>	133,2 ± 7,6	113,6 ± 27,1
UJI027	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	219,8 ± 12,3	157,5 ± 22,0
Controles en negrita; CSal, Castellón aire libre; VLCi, Valencia invernadero			

Tabla 4.1. Contenido fenotípico (media ± error típico, mg·kg⁻¹ de peso fresco) de ácido L ascórbico en las entradas evaluadas de cada ambiente

El contenido fenotípico medio obtenido en los controles de este ensayo realizado es generalmente menor que el valor fenotípico de $200 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ considerado como valor promedio habitual de ácido L-ascórbico en tomate para consumo en fresco (Gould, 1992). Se pueden apreciar variaciones en el contenido fenotípico medio de las entradas y de los controles en cada ambiente. Se observa una reducción general, del contenido de vitamina C en Valencia respecto al contenido en Castellón, que podría haber sido debida a que las condiciones ambientales fueron limitantes, y en estas condiciones disminuye el contenido de esta vitamina (Dumas *et al*, 2003).

Esto se puede constatar al evaluar el comportamiento de los controles que en este tipo de ensayos son muy importantes. Por ello, se han utilizado controles con comportamiento conocido en estas condiciones de ensayo, tanto con bajo contenido en ácido L-ascórbico (FORTUNA-C y UJI026) como con alto contenido (UJI027). En nuestro caso, el control que marca el umbral mínimo de ácido L-ascórbico, FORTUNA-C (*Solanum lycopersicum*), ha mostrado en otras circunstancias valores de hasta $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, mientras que ahora se ha observado un valor máximo de $111,8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, lo cual supone una disminución del 44,1%. En cuanto al control UJI027 (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*), se ha observado en algunos ensayos (Leiva-Brondo *et al*, 2012) valores de hasta $350 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, por lo tanto una reducción de un 36,5% respecto al valor más alto que hemos obtenido. Entonces se puede afirmar que las condiciones de cultivo han reducido la acumulación de ácido L-ascórbico.

Esta amplia variación de los contenidos de ácido L-ascórbico se puede explicar debido a varios factores ambientales. Estos son la temperatura y la radiación solar, factores que tienen un papel predominante en la acumulación de vitamina C. Por lo que respecta a la influencia de la temperatura, la acumulación de ácido L-ascórbico en los frutos de tomate parece correlacionada directamente con ésta (Liptay *et al*, 1986). Se ha sugerido que las temperaturas relativamente altas provocan un descenso en el contenido de ácido L-ascórbico probablemente debido a la oxidación (Murneek, 1954); sin embargo, estas condiciones desfavorables de temperatura, al igual que las de radiación, no han sido estudiadas apropiadamente. A temperaturas favorables, la biosíntesis de ácido L-ascórbico aumenta con la intensidad de la radiación solar (McCollum, 1954; Brown, 1954) debido probablemente al incremento del rango de

4. Resultados y discusión

radiación fotosintética. En cuanto a nuestros ambientes, la temperatura media de cultivo en Castellón varió entre 20 y 30°C mientras que las temperaturas medias de Valencia se situaron entre 2°C y 4°C por encima de las de Castellón debido al cultivo en invernadero (a pesar del uso de sistemas de disipación de calor). Esto indica que en Castellón las temperaturas no fueron excesivamente altas, por lo tanto se podría estimar como unas temperaturas favorables para el desarrollo correcto del ensayo. Sin embargo, en Valencia las temperaturas fueron más altas y las máximas superaron en varias ocasiones los 35°C, por lo que en estas condiciones es bastante probable que afectarán a la acumulación de temperatura que ácido L-ascórbico, disminuyéndola.

En cuanto a la radiación, el incremento del contenido de esta vitamina suele estar correlacionado con el incremento de la radiación. Normalmente, el cultivo al aire libre induce un mayor contenido de ácido L-ascórbico que en invernadero, así como la recolección a finales de verano frente a otras estaciones (López-Andreu *et al*, 1986). La reducción de la acumulación de ácido L-ascórbico en condiciones de baja radiación puede ser más del 70% (Hamner *et al*, 1945; Brown, 1954). Por otro lado, la radiación excesiva no inhibe la acumulación de ácido L-ascórbico pero provoca también una reducción de su contenido (Adegoroye y Jolliffe, 1987). En otros ensayos (Leiva-Brondo *et al*, 2012) desarrollados en nuestra zona se observó que valores de radiación superiores a 2500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ resultaron perjudiciales para la acumulación de ácido L-ascórbico. En los ensayos llevados a cabo en Castellón al aire libre la radiación registrada estuvo de forma general por encima de dicho umbral (alrededor de 3500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ al aire libre). En el ensayo de Valencia los niveles de radiación registrados se situaron aproximadamente entre 1000 y 2340 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Así pues, la radiación resultó ser limitante para la acumulación de ácido L-ascórbico en los dos ensayos, en Castellón por haber valores muy altos al aire libre y en el caso del cultivo protegido en Valencia, el uso de sistemas de sombreado para disipar calor provocó una reducción excesiva de la radiación que también resultó desfavorable para la acumulación de ácido L-ascórbico.

Aunque haya habido una reducción general del contenido fenotípico de las entradas estudiadas en ácido L-ascórbico, provocado principalmente por las condiciones ambientales del medio donde se ha realizado el ensayo, se observan valores

fenotípicos de ácido L-ascórbico prometedores para alguna de las entradas estudiadas. Por ejemplo, hay entradas, como UJI008 y UJI009, en las que se ha obtenido, aproximadamente, un 500% mayor contenido que el control con mayor contenido de vitamina C. Resulta lógico pensar que en condiciones favorables la expresión del carácter para esta entrada puede alcanzar valores muy elevados.

Otros ensayos de evaluación del contenido de ácido L-ascórbico en germoplasma de tomate en nuestras condiciones de cultivo, como los desarrollados por Leiva-Brondo *et al* (2012) y Roselló *et al* (2011), han mostrado una influencia significativa del ambiente en la acumulación de vitamina C, observándose que los controles normalmente tenían contenidos bajos de esta vitamina. Esto corrobora que en nuestras condiciones de cultivo tienden a disminuir la acumulación de vitamina C. Además, se observa que los máximos contenidos en vitamina C se obtienen al aire libre (350 mg·kg⁻¹ en Leiva-Brondo *et al* (2012) y 346 mg·kg⁻¹ en Roselló *et al* (2011)) en ambientes donde la temperatura es óptima, pero hay demasiada radiación, razón por la cual se puede considerar que el material vegetal no alcanza todo su potencial de acumulación de vitamina C. En cambio, bajo invernadero, la acumulación es todavía menor a consecuencia de temperaturas más altas y a las mallas de sombreo, que disminuyeron la cantidad de radiación para actuar como sistemas de disipación de calor.

Aunque, como se ha explicado anteriormente, es posible detectar valores fenotípicos de ácido L-ascórbico interesantes y elevados, se puede observar que al comparar dichos valores de cada entrada en los dos ambientes, la tendencia que siguen éstos no es la misma para todas ellas, lo cual indica que el ambiente se puede manifestar tanto directamente como a través de una interacción importante con algunos genotipos. Por eso, a fin de obtener una mejor estima del potencial genético para el contenido de ácido L-ascórbico en programas de mejora de tomate, resulta necesario conocer la contribución relativa del genotipo, del ambiente y de las interacciones genotipo x ambiente. Para ello se ha llevado a cabo una estima de la contribución de cada uno de estos componentes a la varianza fenotípica.

4. Resultados y discusión

4.2. ESTIMA DE LOS COMPONENTES DE LA VARIANZA FENOTÍPICA DE LOS CARACTERES

Con el objetivo de ver la importancia relativa de la contribución del ambiente, el genotipo y su interacción recurrimos a la descomposición de la varianza fenotípica en sus componentes de varianza. Esta descomposición en sus componentes (Tabla 4.2) muestra que los efectos del bloque (B) dentro del ambiente no fueron significativos, mientras que tanto los efectos genéticos (G) como los efectos ambientales (E) y de interacción genotipo x ambiente (G×E) resultaron altamente significativos ($P < 2.55 \cdot 10^{-11}$). Esto ofrece información real de la contribución relativa de cada uno a la varianza fenotípica total.

Parámetros	Ácido L-ascórbico
V_G	$236,689 \pm 17,905$ (30,16%)**
V_E	$173,559 \pm 12,044$ (22,11%)**
$V_{G \times E}$	$160,355 \pm 11,676$ (20,43%)**
V_B	0 (0%)
V_e	$214,25 \pm 29,247$ (27,30%)**
V_P	$784,853 \pm 68,616$ **

V_G varianza principal genotípica; V_E , varianza principal ambiental; $V_{G \times E}$, varianza genotipo x ambiente; V_e , varianza residual; V_P , varianza fenotípica.
Significativamente diferentes de cero (t- test) al nivel de * $P = 0,05$ y ** $P = 0,01$

Tabla 4.2. Estima del valor los componentes de la varianza (y porcentaje sobre el total de la varianza fenotípica) para el contenido de ácido L-ascórbico de frutos de tomate

A partir de la tabla, se puede observar que porcentaje aportan cada efecto a la varianza fenotípica total. La varianza del genotipo (V_G) aporta un 30,16%, la varianza de la interacción genotipo x ambiente ($V_{G \times E}$) un 20,43% mientras que los efectos ambientales (V_E) aportan un 22,11% a la varianza total del fenotipo. Como ya hemos comentado antes, los efectos del bloque no son significativos, y finalmente la varianza residual (V_e) se sitúa alrededor del 27%. Esto indica, por lo tanto, que se puede considerar que el modelo explica bastante bien la distribución de la variación con los factores incluidos. También resaltar que la varianza ambiental representa alrededor de un cuarto de la varianza fenotípica, así pues se confirma lo expuesto en el apartado 4.1, y podemos afirmar que la gran variabilidad de condiciones ambientales existentes en los dos ambientes de cultivo ha tenido una influencia marcada en el efecto, tanto del ambiente como de la interacción del ambiente con el genotipo.

Se puede considerar que el ácido L-ascórbico juega un papel muy activo e importante en la reducción del daño por oxidación a nivel celular causado por condiciones de estrés (Shigeoka *et al*, 2002) y es muy difícil modelizar cómo influye la interacción G×E debido a factores incontrolados.

El resultado más importante a considerar es que, para la acumulación de vitamina C, la componente genotípica representa valores similares tanto a la varianza del ambiente como de la interacción genotipo x ambiente, indicando que el uso de cultivares de tomate con altos contenidos en ácido L-ascórbico en ambientes adecuados implica la producción de frutos con altos contenidos en ácido L-ascórbico. Esto nos señala la complejidad que supondría cualquier programa de mejora de tomate con el objetivo de aumentar su contenido en vitamina C, ya que para conseguir resultados interesantes, se tendría que partir de fuentes de variación de muy alto contenido y, además, seleccionar ambientes propicios. En caso contrario, no se podría conseguir la finalidad debido al enmascaramiento de la expresión del carácter que produce el ambiente por interacción con el genotipo y a la reducción de la eficacia de la selección.

Hay que resaltar que estos valores globales que hemos obtenido son porcentajes para el conjunto de las entradas ensayadas. Por tanto, para ver el valor genotípico, ambiental y de interacción en cada ambiente y para cada entrada que nos permitirá disponer de información precisa respecto al potencial genético real de cada entrada, recurrimos a la predicción de estos efectos a partir del valor fenotípico.

4. Resultados y discusión

4.3. PREDICCIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN GENOTÍPICA, AMBIENTAL Y DE INTERACCIÓN GENOTIPO X AMBIENTE EN CADA ENTRADA

Con el objetivo de disponer una evaluación más amplia y útil del potencial genético para la acumulación de ácido L-ascórbico de cada una de las entradas estudiadas, se ha llevado a cabo para cada una de ellas una predicción de la descomposición del valor fenotípico de contenido en vitamina C medido para cada entrada en la contribución de sus factores significativos: genotipo directo ($\mu+G$), efecto ambiental directo (E) y las interacciones de los genotipos en los ambientes (Castellón-aire libre y Valencia-invernadero) mediante un modelo general lineal mixto ($Y_{ijk} = \mu + G_i + E_j + GE_{ij}$). Los valores de estas estimas se han representado gráficamente en cada ambiente para que resulte más fácil evaluar el potencial real del material vegetal estudiado. (Figura 4.1)

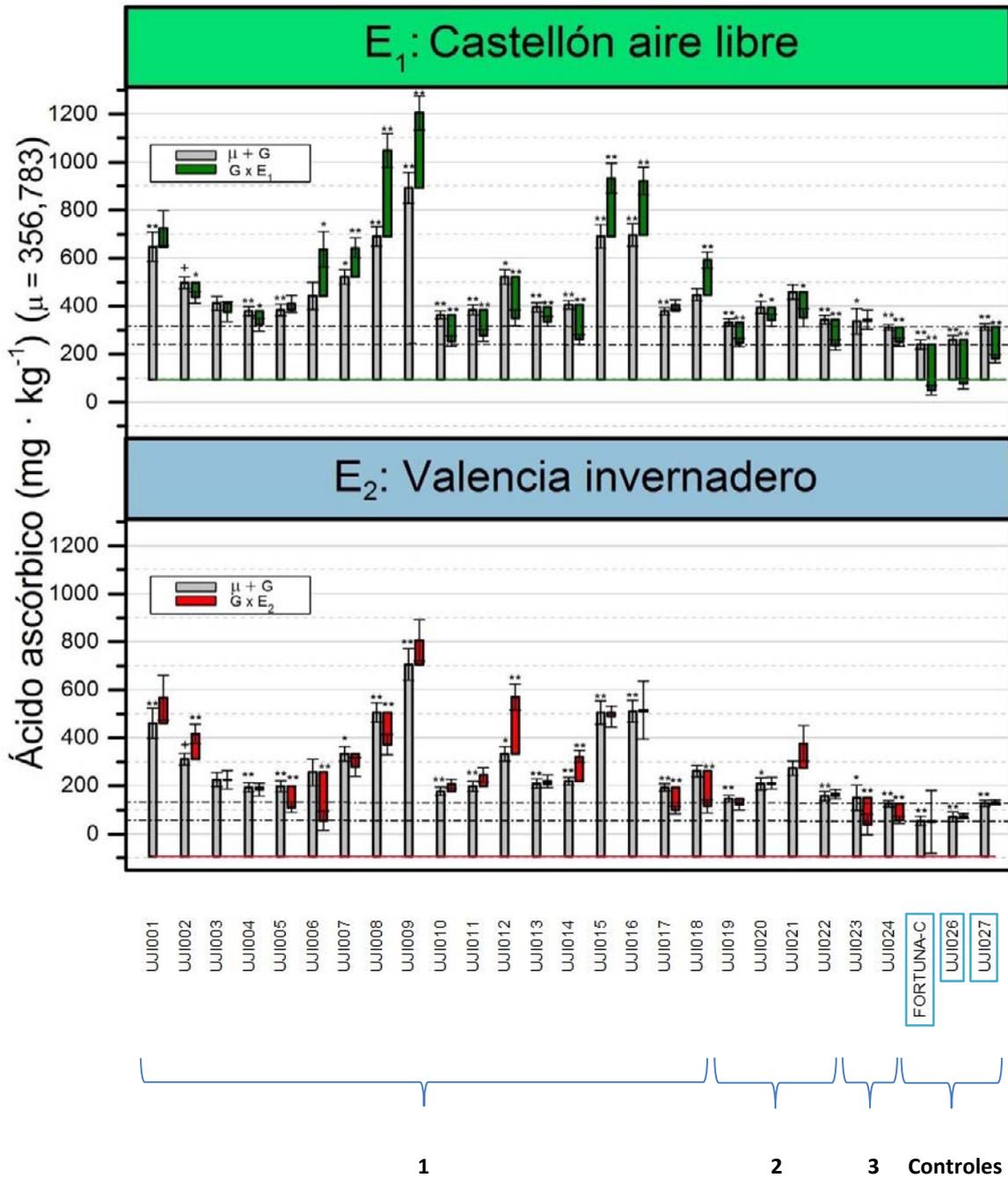


Figura 4.1. Efectos genotípicos y de interacción genotipo x ambiente para el contenido de ácido L-ascórbico de las entradas estudiadas. Valor estimado significativamente diferente de cero (t-test) para [†]P = 0.1, *P = 0.05, **P = 0.01. Los controles en el eje de las X están dentro de rectángulos. Las líneas horizontales de referencia marcan los controles de mayor y de menor expresión genotípica (G) de ácido L-ascórbico; μ , media general; E1, Castellón-aire libre; E2, Valencia-invernadero. Las especies estudiadas son: 1, *Solanum pimpinellifolium*; 2, *Solanum neorickii*; 3, *Solanum chmielewskii*; Controles, *Solanum lycopersicum* en FORTUNA-C y UJI026 y *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* en UJI027.

4. Resultados y discusión

Para cada factor (G, E y GxE), el algoritmo de cálculo centra el valor de los efectos estimados alrededor de la media general del modelo ($\mu = 356,753 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) proporcionando valores positivos para algunos niveles del factor estudiado y negativos para otros.

En el caso del efecto ambiental directo (E), la predicción indica que este efecto es significativo. En Castellón de la Plana (ambiente E_1), la contribución directa del ambiente se estima que aumenta el contenido de ácido L-ascórbico en $93,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ respecto de la media general, mientras que en Valencia (E_2), en el cultivo en invernadero, la disminuye en $93,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (posición de la línea base, verde para E_1 y roja para E_2 respecto el origen de ordenadas en la Figura 4.1). Este efecto ambiental directo no siempre tiene la misma intensidad (Roselló *et al*, 2011) ya que como se ha explicado anteriormente está estrechamente ligado a las condiciones en que se ha desarrollado el cultivo. Incluso se ha observado que, en otros estudios realizados en nuestras latitudes en diferentes años, este efecto ambiental directo no resulta significativo (Leiva-Brondo *et al*, 2012). Por tanto, dado que la magnitud del efecto ambiental directo no es elevada y que en ocasiones puede que no sea significativo, la influencia de este factor en la evaluación de germoplasma de tomate no será muy grande y la distorsión que provoca se podrá minimizar utilizando diversos ambientes y diseños experimentales adecuados.

La estima del efecto genotípico directo ($\mu + G$) es de mayor importancia en la evaluación del potencial de mejora en la acumulación de vitamina C de las entradas ensayadas. Junto con este efecto genotípico directo hay que tener en cuenta la parte de potencial genético que sólo se destapa en determinados ambientes y que se recoge en las estimas de los efectos de interacción de cada genotipo en cada ambiente ($G \times E_1$ y $G \times E_2$). Para evaluar adecuadamente todo el potencial genético de una entrada hay que considerar no sólo la contribución genotípica directa sino también la de interacción con cada ambiente. En la Figura 4.1 el efecto genotípico directo está representado por una barra gris en el eje de abscisas, mientras que la estima de la interacción de cada genotipo en cada ambiente está representado al lado derecho del efecto genotípico directo por una barra, de color verde indicando la interacción $G \times E_1$ y de color rojo mostrando la interacción $G \times E_2$.

Los controles en este ensayo mostraron un potencial genotípico directo más bajo que el contenido fenotípico comunmente aceptado de ácido L-ascórbico ($200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) (Gould, 1992). Los controles FORTUNA-C y UJI026, que muestran contenidos medios o bajos en vitamina C, se presentan en este ensayo, como cabía esperar, con los potenciales genotípicos directos más bajos ($\mu + G_{\text{FortunaC}} = 147,21 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; $\mu + G_{\text{UJI0026}} = 165,26 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). En cuanto a la interacción del genotipo con el ambiente, mostradas por la barra GxE (Figura 4.1), los controles mostraron una gran inestabilidad (interacciones GxE cambiantes). En el ambiente de Castellón al aire libre, éstos presentaron valores previstos significativos ($G_{\text{FortunaC}}\times E_1 = -190 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; $G_{\text{UJI026}}\times E_1 = -181,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) que hicieron disminuir bastante el valor fenotípico. En cambio, en el cultivo de Valencia en invernadero, el efecto de la interacción genotipo x ambiente no fue significativo.

El control de alto contenido en ácido L-ascórbico, UJI027 (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*), en estos estudios ha tenido un comportamiento similar en cuanto a la expresión genotípica y a las interacciones genotipo x ambiente descritas anteriormente en los controles de bajo contenido. Se manifiesta un potencial genotípico directo, como se esperaba, un poco más elevado que los dos controles de bajo contenido de vitamina C ($\mu + G_{\text{UJI0027}} = 220,78 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), y en cuanto a las interacciones del genotipo con el ambiente, también se muestra inestable, ya que es considerablemente negativa en el caso del ambiente E_1 ($G_{\text{UJI026}}\times E_1 = -131,8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e insignificante en E_2 .

Los criterios antes descritos para evaluar el potencial genético real que hemos aplicado a los controles los utilizaremos ahora con el resto de entradas del estudio. Además, tomando como referencia este comportamiento de los controles dispondremos también de una comparación orientativa con otros trabajos. Para facilitar esta comparación, en la figura 4.1 se han representado con líneas horizontales de trazos el rango de respuesta de los controles. De este modo es mucho más directa la evaluación gráfica del comportamiento de las entradas con respecto a los controles y la selección de las que resulten más interesantes tanto por tener un mayor potencial genotípico directo como por su estabilidad o posibilidad de explotar interacciones positivas con determinados ambientes de cultivo.

4. Resultados y discusión

La entrada UJI024, correspondiente a la variedad silvestre de *Solanum chmielewskii*, es la única cuyo valor genotípico directo se sitúa por debajo del control utilizado como alto contenido en ácido L-ascórbico. Otras entradas que mostraron contenidos genotípicos directos similares, aunque un poco más elevados, fueron UJI019, UJI023 y UJI024 (Figura 4.1).

Las entradas UJI001, UJI007, UJI012 y UJI017 ya mostraron un contenido genotípico directo en vitamina C moderadamente más alto que el control UJI027. La entrada UJI001 mostró un valor genotípico directo muy interesante (dobla el valor del control de mayor contenido), si bien es cierto que los valores de la interacción GxE fueron bastante positivos, pero no significativos. Entre estas entradas, la entrada UJI012 mostró ser inestable, ya que mientras en Castellón al aire libre su interacción hacía disminuir la cantidad ($-170 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y reducía drásticamente su valor genotípico total, en Valencia en invernadero el valor de $G_{\text{UJI026}}\times E_1$ era $235,7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Finalmente, las entradas UJI008, UJI009, UJI015 y UJI016 son las que tienen contribuciones genotípicas directas mayores, todas por encima de $595 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Todas estas entradas corresponden a la especie *S. pimpinellifolium*. De hecho, la contribución genotípica directa de la entrada UJI009 ($800 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) casi cuadruplica el valor máximo alcanzado en este estudio del control UJI027. Esta entrada muestra, además de un gran potencial genotípico directo, unas interacciones en los dos ambientes muy positivas, lo cual indica que aunque una parte de su potencial genético se destapa por interacción con el ambiente, en este caso se ha dado tanto en cultivo al aire libre como en cultivo protegido en ciclo de primavera - verano. Estas interacciones incrementan de forma importante su expresión fenotípica y se observa, por lo tanto, que en conjunto es una entrada con un potencial de uso en programas de mejora muy elevado. Por otro lado, otra entrada que nos ofrece un buen contenido genotípico de vitamina C es UJI008, pero, al contrario que la entrada UJI009, es mucho más inestable. En cultivo en Castellón al aire libre muestra una interacción significativa altísima (la mayor de todas las predichas en este estudio), pero en Valencia, ya en cultivo en invernadero, la interacción, también significativa, hace decrecer el contenido total. Por tanto, el posible uso de esta entrada se restringiría al desarrollar materiales adaptados para el cultivo al aire libre en ciclo de primavera – verano

únicamente. Finalmente, en cuanto al análisis de las entradas con mayores contribuciones genotípicas, UJI015 y UJI016 tienen comportamientos muy parecidos. Podemos apreciar que el cultivo en Castellón al aire libre es favorable para el contenido de vitamina C, ya que ambas alcanzan valores genotípicos directos de $600 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, y además estos valores son significativos. En cambio, en Valencia esta contribución extra por parte del ambiente es casi negativa o nula. Por lo tanto, se podría utilizar la entrada UJI009 tanto para desarrollar materiales adaptados al cultivo de primavera – verano en ambientes con temperatura y radiación similares a los estudiados tanto al aire libre como en invernadero, aunque en cultivo al aire libre se aprovecha más su potencial.

Otros estudios, cuyo objetivo ha sido estimar el potencial de entradas estudiadas para luego usarlas en programas de mejora de tomate, también muestran entradas con potencial interesante. En el caso de Leiva-Brondo *et al* (2012), se observan dos entradas de interés, PI365959 y LA1423, la primera por tener un alto potencial genotípico y estabilidad, mientras la otra por, a pesar de su baja estabilidad, también tener un alto potencial genotípico. Sin embargo, el valor máximo genotípico directo que pueden ofrecer estas entradas son de $290 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, es decir, casi tres y cuatro veces menos que el valor obtenido por la entrada de este estudio UJI009 ($800 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Del mismo modo, la entrada con mejor potencial en Roselló *et al* (2011) corresponde a CDP9822 con $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, también con bastante menor acumulación de vitamina C. Todo esto nos muestra, comparando resultados con otros ensayos, que las entradas estudiadas en este estudio, tienen un gran potencial genético para ser usadas en programa de mejora del contenido de ácido L-ascórbico de tomate. Si bien es cierto que las entradas seleccionadas en este estudio pertenecen a *S. pimpinellifolium* y todas tienen frutos muy pequeños y que cuando se transfiera esta capacidad genética de acumulación de vitamina C a *S. lycopersicum* y se recuperen mayores tamaños de frutos el potencial de acumulación de ácido L-ascórbico disminuirá (por efecto dilución al incrementarse el contenido de agua) la gran diferencia entre el contenido evaluado en el control de alto contenido (con frutos de tipo cereza) y las entradas seleccionadas permite asegurar una mejora olgada del carácter.

4. Resultados y discusión

Es interesante resaltar en este estudio el contenido de ácido L-ascórbico desde el punto de vista de las especies analizadas (Figura 4.1). Tanto *Solanum chmielewskii* como *Solanum neorickii* son especies silvestres muy distanciadas filogenéticamente hablando, mientras que la especie *Solanum pimpinellifolium* se considera un ancestro directo del tomate común, *Solanum lycopersicum*. Las muestras de las especies silvestres han presentado los valores más bajos de todas las muestras, muy parecidas a los de los controles. En cambio, las 18 muestras de *S. pimpinellifolium* si que han presentado valores muy interesantes para realizar el objetivo del ensayo.

5. CONCLUSIONES

El contenido de ácido L-ascórbico en las entradas de germoplasma estudiadas en este ensayo, tanto de tomate como de especies silvestres relacionadas, se ha mostrado, en general, muy variable. La proporción promedio de dicha variabilidad fenotípica para todas las entradas estudiadas ha sido debida en un 30,16% al genotipo (G), en un 22,11% al ambiente (E) y en un 20,43% a la interacción entre ambos (GxE).

Por lo tanto, para comprender y entender la contribución de G, E y GxE a la expresión fenotípica del ácido L-ascórbico, es necesario evaluar las entradas o cultivares de tomate en múltiples ambientes. También es importante disponer de controles de contenido normal y otros de contenido alto en ácido L-ascórbico evaluados en distintas campañas y ensayos, para tener una referencia más sólida del potencial de las entradas evaluadas, ya que las condiciones ambientales pueden ser limitantes en algunas ocasiones.

El que la contribución de la interacción GxE en la expresión fenotípica del contenido en ácido L-ascórbico sea importante implica que, para desarrollar nuevas variedades de tomate con elevado contenido en éste, será necesario emplear fuentes de variabilidad con contenidos muy elevados y que, al ser evaluadas en diversos ambientes, hayan mostrado elevada estabilidad (interacciones GxE despreciables) o un efecto positivo de la interacción GxE en la expresión del carácter.

También la importancia de E será clave, ya que una buena elección del ambiente de cultivo, atendiendo sobretudo a la temperatura y a la radiación, nos permitirá obtener frutos con mayor contenido en vitamina C y facilitar su acumulación. Para los materiales ensayados se concluye que en el ambiente al aire libre la reducción de acumulación de vitamina C es menor que en invernadero.

De entre las entradas evaluadas, destacan especialmente UJI008, UJI009, UJI015 y UJI016, a pesar de que las condiciones de radiación en los ensayos han disminuido la acumulación de ácido L-ascórbico aproximadamente a la mitad (tal como indica el comportamiento de los controles). Estas entradas han mostrado un alto potencial genotípico para la mejora del contenido de vitamina C en nuevas variedades de tomate dirigidas a los mercados que aprecian la calidad nutricional y funcional.

5. Conclusiones

La entrada UJI009 (*S. pimpinellifolium*) fue la que mostró un mayor valor genotípico directo ($\mu + G$) para la expresión de ácido L-ascórbico (3,62 veces mayor que el expresado por el control de mayor contenido UJI027). UJI008, UJI015 y UJI016 (2,63 veces mayor que el control de mayor contenido UJI027) también son interesantes. Hay que considerar además que, en el caso de UJI009 las interacciones G×E cuando se dan son todas positivas e incrementan el potencial genético de expresión del carácter por lo que dicha entrada se muestra como un parental muy interesante para ser utilizado en programas de mejora del contenido de ácido L-ascórbico en tomate. Por el contrario, aunque UJI008 muestra la interacción G×E positiva más elevada en un ambiente determinado y un potencial genotípico total bastante elevado, también posee una interacción negativa importante en otro tipo de ambiente, por lo que sus posibilidades de uso se restringen al desarrollo de materiales para cultivo al aire libre en ciclo de primavera-verano. Por el contrario, UJI015 y UJI016, son materiales muy estables para la expresión de este carácter.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abushita, A.A., Hebshi, E.A., Daood, H.G., Biacs, P.A. (1997). *Determination of antioxidant vitamins in tomatoes*. Food Chemistry 60, 207-212.
- Abushita, A.A., Daood., HG., Biacs, P.A. (2000). *Change in Carotenoids and Antioxidant Vitamins in Tomato as a Function of Varietal and Technological Factors*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 2075-2081.
- Adalid, A.M., Roselló, S., Nuez, F. (2004). *Breeding tomatoes for their high nutritional value*. pp 35-52. In: Recent Research Developments in Plant Science. Transworld Research Network, Trivandrum, Kerala.
- Adalid, A.M.; Roselló, S; Cebolla-Cornejo, J.; Nuez, F. (2008). *Evaluation and selection of Lycopersicon accessions for hig carotenoid and vitamin C content*. Acta Horticulturae, 789, 221-227.
- Adegoroye, A.S. and Jolliffe, P.A. (1987). *Some inhibitory effects of radiation stress on tomato fruit ripening*. Journal of the Science of Food and Agriculture 39, 297-302.
- Agius, F. González-Lamothe, R., Caballero, J.L., Muñoz-Blanco, J., Botella, M.A., Valpuesta, V. (2003). *Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpresion of a D-galacturonic acid reductase*. Nature Biotechnology 21, 177-181.
- Aldrich, H.T, Salandanan, K., Kendall, P., Bunning, M., Stonaker, F., Kulen, O., Stushnoff, C. (2010). *Cultivar choice provides options for local production of organic and conventionally produced tomatoes with higher quality and antioxidant content*. Journal of Science of Food and Agriculture, 90, 2548-2555.
- Alós, E., Rodrigo, M.J., Zacarías, L. (2013). *Transcriptomic analysis of genes involved in the biosynthesis, recycling and degradation of L-ascorbic acid in pepper fruits (Capsicum annuum L.)*. Plant Science 207, 2– 11.

6. Bibliografía

- Angosto, T. and Borja, A. (2001). *Mejora biotecnológica de la calidad del fruto*. In: *Biotecnología de cultivos hortícolas*. (eds. Lozano Ruiz, R. and Cuadrado Gomez, I. M.), pp. 125-143. Junta de Andalucía.
- Anónimo. (1995). *Phytochemicals Drugstore in a salad?*. Consumer Reports of Health 7, 133-135.
- Anónimo. (1998). *Vitamin supplements*. The Medical Letter on Drugs and Therapeutics 40, 75-77.
- Aruoma, O. I. (1999). *Antioxidant actions of plant foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy*. Free Radical Research 30, 419-427.
- Barrett, M. D. (2003). *Antioxidants and Other Phytochemicals: Current Scientific Perspective*. <http://www.quackwatch.org/03HealthPromotion/antioxidants.html>.
- Bartoli, C.G., Pastori, G.M., Foyer, C.H. (2000). *Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV*. Plant Physiology 123, 335–343
- Beecher, G.R., (1998). *Nutrient content of tomato and tomato products*. Proc Soc Exp Biol Med 218, 98–100.
- Bendich, A. (2004). *From 1989 to 2001: What Have We Learned About the "Biological Actions of Beta-Carotene"?* The Journal of Nutrition 225S-230S.
- Bertram, J.S. and Vine, A.L. (2005). *Cancer prevention by retinoids and carotenoids: Independent action on a common target*. Biochimica et Biophysica Acta 1740, 170-178.
- Bhatt, R. P., Biswas, V. R., and Kumar, N. (2001). *Heterosis, combining ability and genetics for vitamin C, total soluble solids and yield in tomato (Lycopersicon esculentum) at 1700 m altitude*. Journal of Agricultural Science 137, 71-75.

- Bhatt, RP., Biswas, VR., Pandey, HK, Verma, GS and Kumar, N *et al.* (1998). *Heterosis for vitamin C in tomato (Lycopersicon esculentum)*. Indian Journal of Agricultural Sciences 68, 176-178.
- Bouis, H. E. (2003). *Micronutrient fortification of plants through plant breeding: can it improve nutrition in man at low cost?* Proceedings of the Nutrition Society 62, 403-411.
- Bouma J, Varallyay G and Batjes NH, (1998). *Principal land use changes anticipated in Europe*. Agric Ecosyst Environ 67:103–119.
- Brown, G.B., (1954). *The ascorbic acid content of tomatoes as related to illumination*. J Am Soc Hortic Sci 65:342–348.
- Byers, T. and Guerrero, N. (1995). *Epidemiologic evidence for vitamin C and vitamin E in cancer prevention*. American Journal of Clinical Nutrition 62, 1385S-1392S.
- Canene-Adams, K., Campbell, J.K., Zaripheh, S., Jeffery, E.H., Erdman, J.W. (2005). *The tomato as a functional food*. Journal of Nutrition 135, 1226–1230.
- Causse, M., Saliba-Colombani V, Lecomte L, Duffé P, Rousselle P and Buret M. (2002). *QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits*. Journal of Experimental Botany 53, 2089-2098.
- Causse, M., Buret M, Robini K and Verschave P. (2003). *Inheritance of nutritional and sensory quality traits in fresh market tomato and relation to consumer preferences*. Journal of Food Science 68, 2342-2350.
- Chandra, H.M., Ramalingam, S. (2011). *Antioxidant Potentials of Skin, Pulp, and Seed Fractions of Commercially Important Tomato Cultivars*. Food Science and Biotechnology, 20: 15- 21.
- Chassy, A. W. *et al.* (2006). *Three-Year Comparison of the Content of Antioxidant Microconstituents and Several Quality Characteristics in Organic and Conventionally*

6. Bibliografía

Managed Tomatoes and Bell Peppers. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 8244-8252.

Chen, Z. et al. (2003). *Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling*. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 3525-3530.

Chung-Ahuja, J. K. et al. (1993). *The development and application of a carotenoid database for fruits, vegetables, and selected multicomponent foods*. J.Amer.Diet.Assoc. 93, 318-323.

Clifford, M. N. (1999). *Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 79, 362-372.

Clinton, S. K. (1998). *Lycopene: Chemistry, biology and implications for human health and disease*. Nutrition Reviews 1, 35-51.

Collins, AR. (2004). *Oxidative DNA damage: The link with fruit and vegetables*. AGRO FOOD INDUSTRY HI-TECH 15, 23.

Conklin, P. L. et al. (2006). *Arabidopsis thaliana VTC4 encodes L-galactose-1-P phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme*. Journal of Biological Chemistry 281, 15662-15670.

Daskaloff, C. et al. (1981). *The inheritance of some quantitative characters determining tomato fruit quality in view of developing high quality lines and cultivars*. Genetics and breeding of tomato 128, 121-128.

Davies, J.N., Hobson, G.E. (1981). *The constituents of tomato fruit. The influence of environment, nutrition and genotype*. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition; November, 205-280.

Demmig-Adams, B. and Adams, W. W. I. (2002). *Antioxidants in Photosynthesis and Human Nutrition*. Science 298, 2149-2150.

- Dorgan, J. F. et al. (1998). *Relationship of serum carotenoids, retinol, α -tocopherol and selenium with breast cancer risk: results from a prospective study in Columbia, Missouri*. *Cancer Causes Control* 9, 89-97.
- Duarte, T. L. and Lunec, J. (2005). *When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C*. *Free Radical Research* 39, 671-686.
- Dulinska, J. et al. (2005). *Different effect of beta-carotene on proliferation of prostate cancer cells*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740, 189-201.
- Dumas, Y. et al. (2003). *Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 83 (5) 369-382, 101 ref 83, 369-382.
- El-Gizawy, A. M. et al. (1993). *Effect of different shading levels on tomato plants. 2. Yield and fruit quality*. *Acta Horticulturae* 323, 349-354.
- Eskin, N.A.M. *Quality and preservation of fruits*. Boca Ratón, FL, EEUU: CPR Press, 1991.
- Esquinas-Alcázar, J. T. and Nuez, F. (1995). *Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate*. In: *El cultivo del tomate* (ed. Nuez, F.), pp. 13-42. Madrid: Ediciones Mundi Prensa.
- Fanasca, S. et al. (2006). *Changes in Antioxidant Content of Tomato Fruits in Response to Cultivar and Nutrient Solution Composition*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4319-4325.
- FAOSTAT. (2014). Obtenido de <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>
- Farah, A. and Donangelo, C.M., (2006). *Phenolic compounds in coffee*. *Braz J Plant Physiol* 18, 23–36.
- Frankel, E. N. (1995). *Natural and biological antioxidants in foods and biological systems. Their mechanism of action, applications and implications*. *Lipid Technology* 7, 77-80.

6. Bibliografía

- Galiana-Balaguer, L. et al. (2001). *Determination of L-Ascorbic Acid Lycopersicon fruits by Capillary Zone Electrophoresis*. Analytical Biochemistry 296, 218-224.
- Garcia, E. and Barrett, M. D. (2006). *Assessing lycopene content in california processing tomatoes*. Journal of Food Processing and Preservation 30, 56-70. Ref Type: Electronic Citation
- Garg, N; Cheema, DS; Dhatt, AS. (2008). *Genetics of yield, quality and shelf life characteristics in tomato under normal and late planting conditions*. Euphytica, 159, 275-288.
- Girija, R. et al. (1996). *Serum carotene, vitamin A, and vitamin C levels in breast cancer and cancer of the uterine cervix*. Nutrition and Cancer 25, 173-177.
- Giuntini, D. et al. (2005). *Changes in Carotenoid and Ascorbic Acid Contents in Fruits of Different Tomato Genotypes Related to the Depletion of UV-B Radiation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 3174-3181.
- Gould WA, (1992). *Tomato Production, Processing and Technology*. CTI Publications, Baltimore, MD.
- Gross, J. (1991). *New York: Chapman and Hall*.
- Hagimori, M. et al. (2005). *Breeding of Tomato with High L-Ascorbic Acid Content by Clonal Selection*. Journal of Japanese Society of Horticultural Science 74, 16-22.
- Halliwell, B. (1992). *How to characterise biological antioxidant*. Free Rad.Res.Commun 9, 1-32.
- Hamner, K. C., Bernstein, L., and Maynard, L. A. (1945). *Effects of light intensity, day length, temperature, and other environment factors on the ascorbic acid content of tomatoes*. J.Nutr. 29, 85-97.
- Hancock, R. D. and Viola, R. (2005). *Improving the Nutritional Value of Crops through Enhancement of L-Ascorbic Acid (Vitamin C) Content: Rationale and*

- Biotechnological Opportunities*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 5248-5257.
- Hanson, P. M. et al. (2004). *Variation for antioxidant activity and antioxidants in tomato*. Journal of the American Society for Horticultural Science 129, 704-711.
- Harmeyer, J. (2002). *The physiological role of L-carnitine*. Lohmann Information 27, 15-22.
- Hart, D. J. and Scott, K. J. (1995). *Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK*. Food Chemistry 54, 101-111.
- Hennekens, C. H., Buring, J. E., and Peto, R. (1994). *Antioxidant Vitamins -- Benefits Not Yet Proved*. New England Journal of Medicine 330, 1080-1081.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., and Katan, M. B. (1992). *Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40, 2379-2383.
- Ioannidi, E., Kalamaki, M.S., Engineer, C., Pateraki, I., Alexandrou, D., Mellidou, I., Giovannonni, J., Kanellis, AK. (2009). *Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions*. Journal of Experimental Botany, 60, 663-678.
- Jack, D.B., (1995). *Keep taking the tomatoes—the exciting world of nutraceuticals*. Molecular Medicine Today 1, 118–121.
- Jain, A. K. and Nessler, C. L. (2000). *Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants*. Molecular Breeding 6, 73-78.
- Jamison, J. M. et al. *Evaluation of the in vitro and in vivo antitumor activities of vitamin C and K-3 combinations against human prostate cancer. The role of nutrition in preventing and treating breast and prostate cancer Washington, DC, USA, 31 August-1 September 2000*. Journal-of-Nutrition. 2001, 131, 158S-160S.

6. Bibliografía

- Kader, A.A. (1992). *Postharvest technology of horticulture crops*. University of California.
- Khan, M. S. et al. (1999). *Genetic análisis on nutritional characteristics of chilli (Capsicum annuum L.) varieties available in Bangladesh*. Bangladesh Journal of Botany 28, 109-115.
- Kumar, R., Klein, D., Krumbein, A., Kopke, U. (2007). *Product quality of greenhouse tomatoes: Effect of cultivars, organic N-fertilization and harvest time*. European Journal of Horticultural Science, 72, 46-51.
- Kun, Y., Lule, U. S., and Xiao-Lin, D. (2006). *Lycopene: Its properties and relationship to human health*. Food Reviews International 22(4), 309-333. Ref Type: Electronic Citation
- Lee, H. A. et al. (1991). *Rapid biospecific methods of vitamin analysis*. Journal of Micronutrient Analysis 7, 261-270.
- Lee, S. K. and Kader, A. A. (2000). *Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops*. Postharvest Biology and Technology 20, 207-220.
- Leiva-Brondo, M., Valcárcel, M., Cortés-Olmos, C., Roselló, S., Cebolla-Cornejo, J., Nuez, F. (2012). *Exploring alternative germplasm for the development of stable high vitamin C content in tomato varieties*. Scientia Horticulturae 133, 84–88.
- Lenucci, M. S. et al. (2006). *Antioxidant Composition in Cherry and High-Pigment Tomato Cultivars*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 2606-2613.
- Libby, P. and Aikawa, M. (2002). *Vitamin C, collagen, and cracks in the plaque*. Circulation 105, 1396-1398.
- Liptay, A. et al. (1986). *Ascorbic acid levels in tomato (Lycopersicon esculentum Mill) at low temperatures*. Agric.Biol.Chem. 50, 3185-3187.

- López-Andreu, F.J., Lamela, A., Esteban, R.M. and Collado, G.J. (1986). *Evolution of quality parameters in the maturation stage of tomato fruits*. Acta Horti 191:387–394.
- Lorence, A., Chevone, B.I., Mendes, P., Nessler, C.L. (2004). *Myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis*. Plant Physiol 134, 1200–1205.
- Luthria, D. L., Mukhopadhyaya, S., and Krizek, D. T. (2006). *Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation*. Journal of Food Composition and Analysis 19, 771-777.
- Lutsenko, E. A., Carcamo, J. M., and Golde, D. W. (2002). *Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress*. Journal of Biological Chemistry 277, 16895-16899.
- MAGRAMA.(2014).
<http://www.magrama.gob.es/app/MaterialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?idFicha=2193>.
- Magiorkinis, E., Beloukas, A., Diamantis, A. (2011). *Scurvy: Past, present and future*. European Journal of Internal Medicine, 22:147-152.
- Marchioli, R. et al. (2000). *Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: epidemiological and clinical trial data. Prevention and treatment of vascular disease: a nutrition based approach*, Ácido L-ascórbico, Denmark, 36, S53-S63.
- Martinez-Valverde, I. et al. (2002). *Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (Lycopersicon esculentum)*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 82, 323-330.
- Maruta, T., Ichikawa, Y., Mieda, T., Takeda, T., Tamoi, M., Yabuta, Y., Ishikawa, T., Shigeoka, S. (2010). *The contribution of Arabidopsis homologs of L-gulonolactone oxidase to ascorbate biosynthesis in tomato*. Plant Cell Physiol 51, 1003-1012.

6. Bibliografía

lactone oxidase to the biosynthesis of ascorbic acid. Biosci Biotech Bioch 74, 1494–1497.

Mayne, S.T. (1996). *Beta-carotene, carotenoids and disease prevention in humans*. FASEB J 10:690–701

McCollum, J.P. (1954). *Effects of light on the formation of carotenoids in tomato fruits*. Food Res 19:182–189.

Menrad, K. (2003). *Market and marketing of functional food in Europe*. J Food Eng 56:181–188.

Millar, A.H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J.L., Bartoli, C.G., Theodoulou, F.L., Foyer, C.H. (2003) *Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses*. Plant Physiol 133: 443–447

Miller, R.G. (1974). *The jackknife: a review*. Biometrika 61:1–15.

Munne, B. S. and Alegre, L. (2000). *Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in Rosmarinus officinalis plants*. Planta 210, 925-931.

Murneek, A.E., Maharg, L. and Witter, S.H. (1954). *Ascorbic acid (vitamin C) content of tomatoes and apples*. Univ Missouri Agric Exp Stn Res Bull 568, 3–24.

Nasolodin, V. V. et al. (1996). *Interrelationship between vitamin C and trace elements and their role in the prevention of iron-deficiency conditions - a review*. Gigena i Sanitariya 6, 26-29.

Nunes-Nesi, A. et al. (2005). *Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants*. Plant Physiology 137, 611-622.

Nuez, F., Diez, M.J., Pico, B., Fernandez de Cordova, P. (1996). *Catálogo de semillas de tomate*. Madrid: Ministeria de Agricultura, Pesca y Alimentación.

- Oke, M. *et al.* (2005). *Effects of Phosphorus Fertilizer Supplementation on Processing Quality and Functional Food Ingredients in Tomato*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 1531-1538.
- Omenn, G. S. *et al.* (1996). *Effects of a Combination of Beta Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease*. New England Journal of Medicine 334, 1150-1155.
- Omoni, A. O. and Aluko, R. E. (2005). *The anticarcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review*. Trend in Food Science and Technology 16, 344-350.
- Paganga, G., Miller, N., and Rice-Evans, C. A. (1999). *The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute?* Free Radical Research 30, 153-162.
- Phillips, C. L. *et al.* (1997). *Vitamin C, collagen biosynthesis, and aging*. Vitamin C in health and disease 205-230.
- Pignocchi, C. and Foyer, C. H. (2003). *Apoplatic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling*. Current Opinion in Plant Biology 6, 379-389.
- Podsdek, A., Sosnowska, D., and Anders, B. (2003). *Antioxidative capacity of tomato products*. European Food Research and Technology 217, 296-300.
- Pols-JC, v. d. and van der Pols, J. C. (1998). *A possible role for vitamin C in age-related cataract. Meat or wheat for the next millenium?* University of Surrey, Guildford, 58, 295-301.
- Raffo, A. *et al.* (2006). *Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (Lycopersicon esculentum cv. Naomi F1)*. Journal of Food Composition and Analysis 19, 11-19.
- Rao, AV., Rao, L.G. (2007). *Carotenoids and human health*. Pharmacological Research, 55, 207-216.

6. Bibliografía

- Rapola, J. M. *et al.* (1997). *Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction*. *Lancet* 349, 1715-1720.
- Rizzolo, A. and Polesello, S. (1992). *Chromatographic determination of vitamins in foods*. *Journal of Chromatography* 624, 103-152.
- Romer, S. and Fraser, P. D. (2005). *Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation*. *Planta* 221, 305-308.
- Rosales, M. A. *et al.* (2006). *Antioxidant content and ascorbate metabolism in cherry tomato exocarp in relation to temperature and solar radiation*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 1545-1551.
- Roselló, S. *et al.* (2002). *Simultaneous quantitation of the main organic acids and carbohydrates involved in tomato flavour using capillary zone electrophoresis*. *Jsci food agric* 82, 1101-1106.
- Roselló, S., Galiana-Balaguer, L., and Nuez, F. (2000a). *Mejora de la calidad interna del tomate para consumo en fresco: cribado preliminar de entradas de Lycopersicon*. *Actas de Horticultura* 30, 173-180.
- Roselló, S., Galiana-Balaguer, L., and Nuez, F. (2000b). *Sources of high soluble solid and vitamin C content from Lycopersicon pimpinellifolium are interesting in breeding for internal quality of fresh market tomato*. *Tomato Genetics Cooperative Report* 50, 33-34.
- Roselló, S., Adalid, A.M., Cebolla-Cornejo, J. and Nuez, F. (2011). *Evaluation of the genotype, environment and their interaction on carotenoid and ascorbic acid accumulation in tomato germplasm*. *J Sci Food Agric* 91, 1014–1021
- Rosenfeld, H. J. (1999). *Quality improvement of vegetables by cultural practices*. *Acta Horticulturae* , 483. ISHS. Ref Type: Electronic Citation
- Ross, D.A. (1998). *Vitamin A and public health; Challenges for the next decade*. *Proc. Nutr. Soc.* 57, 159-165.

- Rousseaux, M. C. *et al.* (2005). *QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using *Lycopersicon pennellii* introgression lines*. Theoretical and Applied Genetics 111, 1396-1408.
- Rumsey, S. C. and Levine, M. (2000). *Vitamin C*. Chemical Analysis 154, 411-445.
- Russell, R., Wang, X. D., and Mayer, J. (1999). *Why megadoses of beta carotene may promote lung cancer*. USDA Agricultural Research Service Food & Nutrition Research Briefs January, 1.
- Saha, S., Hedau, N.K., Mahajan, V., Singh, G., Gupta, H.S., Gahalain, A. (2010). *Textural, nutritional and functional attributes in tomato genotypes for breeding better quality varieties*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90, 239-244.
- Sanmartin, M. *et al.* (2003). *Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone*. Planta 216, 379-389.
- Serio, F., Leo, L., Parente, A., Santamaria, P. (2007). *Potassium nutrition increases the lycopene content of tomato fruit*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 82, 941-945.
- Seymour, G.B., Taylor, J.E., Tucker, G.A., editors. (1993). *Biochemistry of fruit ripening*. New York, Chapman & Hall
- Shao, A. and Hathcock, J. N. (2006). *Risk assessment for the carotenoids lutein and lycopene*. Regulatory Toxicology and Pharmacology 45, 289-298.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. (2002). *Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes*. J Exp Bot 53, 1305–1319.
- Somers, G. F., Kelly, W. C., and Hamner, K. C. (1951). *Influence on fruit supply upon the ascorbic content of tomatoes*. Am.J.Bot. 38, 472-475.

6. Bibliografía

- Stacewicz-Sapuntzakis, M. and Bowen, P. E. (2005). *Role of lycopene and tomato products in prostate health*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740, 202-205. Ref Type: Electronic Citation
- Stevens, M.A. and Rick, C.M., (1986). *Genetics and breeding, in The Tomato Crop. A Scientific Basis for Improvement*, ed by Atherton JG and Rudich J. Chapman & Hall, London, pp. 35–109
- Stevens, R., Buret, M., Duffe, P., Garchery, C., Baldet, P., Rothan, C., Causse, M. (2007). *Candidate genes and quantitative trait loci affecting fruit ascorbic acid content in three tomato populations*. *Plant Physiology*, 143, 1943-1953.
- Story, E.N., Kopec, R.E., Schwartz, S.J., Harris, G.K. (2010). *An Update on the Health Effects of Tomato Lycopene*. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 187-210.
- Taber, H., Perkins-Veazie, P., Li, S., White, W., Roderniel, S., Xu, Y. (2008). *Enhancement of tomato fruit lycopene by potassium is cultivar dependent*. *Hortscience*, 43, 159-165.
- Tang, G.W., Qin, J., Dolnikowski, G.G., Russell, R.M., Grusak, M.A. (2009). *Golden Rice is an effective source of vitamin A*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 1776-1783
- Tee, E.S. (1992). *Carotenoids and retinoids in human nutrition*. *Crit rev food Sci Nutri*. 31, 103-163
- Tessier, F. et al. (1998). *Decrease in vitamin C concentration in human lenses during cataract progression*. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 68, 309-315.
- Thyboa, A. K. et al. (2006). *Effect of organic growing systems on sensory quality and chemical composition of tomatoes*. *LWT* 39, 835-843.

- Tokunaga, T. et al. (2005). *Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase*. *Planta* 220, 854-863.
- Toora, R. K., Savagea, G. P., and Heeb, A. (2006). *Influence of different types of fertilisers on the major antioxidant components of tomatoes*. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 20-27.
- USDA, United States Department of Agriculture (2014). Obtenido en <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3270?qlookup=11529&format=Full&max=25&man=&facet=&new=1#id-2>
- Valero, M. P. et al. (2002). *Vitamin C is associated with reduced risk of cataract in a Mediterranean population*. *Journal of Nutrition* 132, 1299-1306.
- Venter, F. (1977). *Solar radiation and vitamin C content of tomato fruits*. *Acta Horticulturae* 58, 121-127.
- Webb, P. M. et al. (1997). *Gastric cancer, gastritis and plasma vitamin C: Results from an international correlation and cross-sectional study*. *International Journal of Cancer* 73, 684-689.
- Wheeler, G. L., Jones, M. A., and Smirnoff, N. (1998). *The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants*. *Nature* 393, 365-369.
- Wolucka, B.A., Van Montagu, M. (2003). *GDP-mannose 3,5 – epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants*. *J Biol Chem* 278, 47483–47490.
- You, W. C. et al. (2000). *Gastric dysplasia and gastric cancer: Helicobacter pylori, serum vitamin C, and other risk factors*. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 1607-1612.
- Zhang, Y. et al (2013). *Ascorbic Acid Accumulation is Transcriptionally Modulated in High-Pigment-1 Tomato Fruit*. *Plant Mol Biol Rep* 32, 52–61.

6. Bibliografía

Zhou, K. and Yu, L. (2006). *Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado*. LWT 39, 1155-1162.

Zhu, J. and Weir, B.S. (1996). *Diallel analysis for sex-linked and maternal effects*. Theor Appl Genet 92, 1–9.

Zou, L.P., Li, H.X., Ouyang, B., Zhang, JH., Ye, Z.B. (2006). *Cloning and mapping of genes involved in tomato ascorbic acid biosynthesis and metabolism*. Plant Science, 170, 120-127.