

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE ECOSISTEMAS  
AGROFORESTALES



***RELACIÓN ENTRE LAS CONDICIONES AMBIENTALES Y  
LA MADURACIÓN INTERNA DEL FRUTO DE CITRUS  
SINENSIS CVS. M7 (MUTANTE) Y NAVELINA  
(PARENTAL)***

TRABAJO FIN DE MÁSTER  
EN MÁSTER UNIVERSITARIO EN SANIDAD Y PRODUCCIÓN  
VEGETAL

ALUMNO: Pedro Robledo Rodríguez

TUTOR: Carlos Mesejo Conejos

Curso Académico: 2017/2018

VALENCIA, septiembre 2018



## RESUMEN

La maduración de los frutos cítricos depende de factores endógenos, relativos al genotipo, y de factores exógenos, relativos a las condiciones ambientales. La relación entre los factores ambientales, en particular la temperatura, y la maduración externa ha sido ampliamente estudiada. Así, la reducción de la temperatura ambiental y del suelo estimulan el cambio de color del fruto. Sin embargo, la relación entre las condiciones ambientales y la maduración interna no se ha estudiado en profundidad, particularmente, en condiciones de aridez. En el presente estudio se determina 1) la evolución de la maduración interna (acidez y SST) y 2) el perfil metabolómico de carbohidratos y ácidos del ciclo de Krebs, de frutos cvs. de naranja dulce M7 (mutación precoz) y Navelina (parental) cultivados en 5 regiones españolas con diferencias climáticas significativas (2 fincas en Valencia, y 1 en Murcia, Córdoba y Huelva). El objetivo de este TFM es determinar la relación entre las condiciones ambientales y el metabolismo de los azúcares y los ácidos durante la maduración de los frutos cítricos.

*Palabras clave: acidez, maduración, cítricos, ácidos, azúcares, condiciones ambientales.*



## ABSTRACT

Ripening of citrus fruits depends on endogenous factors, related to genotype, and exogenous factors related to environmental conditions. The relationship between environmental factors, particularly temperature, and external ripening has been widely studied. The reduction of the ambient and soil temperature stimulates fruit color change. However, the relationship between environmental conditions and internal ripening has not been studied in depth, particularly in arid conditions. In the present study it is determined 1) the evolution of the internal ripening (acidity and SST) and 2) the metabolomic profile of carbohydrates and acids of the Krebs cycle, of *Citrus sinensis* cvs. M7 (early mutation) and Navelina (wild type) grown in 5 Spanish regions with significant climatic differences (2 orchards in Valencia, and 1 in Murcia, Córdoba and Huelva). The objective of this study is to determine the relationship between the environmental conditions and the metabolism of sugars and acids during the process of citrus fruit ripening.

*Keywords: Acidity, maturation, citric acid, sugars. environmental conditions*



## RESUM

La maduració dels fruits cítrics depén de factors endògens, relacionats amb el genotip, y de factors exògens, relacionats amb les condicions ambientals. La relació entre els factors ambientals, en particular la temperatura, i la maduració externa ha estat ampliament estudiada. Així, la reducció de la temperatura ambiental i del sòl estimulen el canvi del color del fruit. Nogensmenys, la relació entre les condicions ambientals i la maduració interna no s'han estudiat en profunditat, particularment, en condicions d'aridesa. Al present estudi es determina 1) l'evolució de la maduració interna (acidesa i SST) i 2) el perfil metabolòmic de carbohidrats i àcids del cicle de Krebs, als fruits dels cvs. de taronger dolç M7 (mutació precoç) i Navelina (parental) cultivats en 5 regions amb diferències climàtiques significatives (2 finques a València, i 1 en Murcia, Còrdova i Huelva). L'objectiu d'aquest TFM es determinar la relació entre les condicions ambientals i el metabolisme de sucres i àcids durant la maduració dels fruits cítrics.

*Paraules clau: acidesa, maduració, cítrics, àcids, sucres, condicions ambientals.,*





## **Agradecimientos**

A lo largo de mi vida como alumno han sido muchos los profesores que me han transmitido su pasión por la ingeniería y la ciencia, por adquirir conocimiento, por superarse uno mismo y, sobre todo, la ilusión por aprender. En parte, gracias a vuestro afán por transmitir estos valores, hoy me encuentro escribiendo estas líneas.

Gracias a todos vosotros.

Quiero agradecer a Víctor Marcelo Gabella el compromiso, dedicación, y amabilidad que siempre me ha mostrado. Como profesor y tutor de anteriores proyectos, siempre has sido impecable en tu labor tanto personal como profesional, y quiero aprovechar otra ocasión más para agradecértelo.

Gracias Víctor.

Este trabajo fin de máster no sería posible sin el apoyo y profesionalidad de Carlos Mesejo Conejos. Estoy muy agradecido por ello, por ayudarme en mis primeros pasos en la ciencia experimental y descubrirme una forma de pensar diferente a la que estaba acostumbrado, abriendo nuevos senderos en mi pensamiento científico. Estoy seguro que los recuerdos que guarde de nuestras conversaciones y tus clases me seguirán enseñando en un futuro.

Gracias Carlos.

Durante el transcurso del máster, siempre ha habido cuatro personas que han estado preocupadas por el éxito final de esta nueva etapa universitaria; y me refiero a mis padres, mi hermano y mi pareja, a los que adoro y quiero por encima de todo. Es por vuestro apoyo, consejos y ánimo que me habéis brindado, que os dedico el trabajo fin de máster.

¡Gracias familia!

*Dedicado a  
mis padres,  
mi hermano,  
y mi pareja*



## CONTENIDO



<b>Resumen .....</b>	<b>3</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>5</b>
<b>Resum .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>15</b>
1. La maduración de los cítricos.....	19
1.1. Metabolismo de ácidos. El ácido cítrico. ....	20
1.2. Metabolismo de azúcares .....	23
2. Influencia de los factores ambientales en la maduración interna de los frutos cítricos .....	24
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
1. Material vegetal y diseño experimental .....	33
2. Métodos.....	35
3. Análisis estadístico.....	37
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
1. Efecto del ambiente y la variedad en la acidez y contenido en sst del fruto .....	41
1.1. Condiciones ambientales.....	41
1.2. Influencia de la parcela y la variedad en la acidez del fruto .....	45
1.3. Influencia de la parcela y la variedad en el contenido en sst del fruto.....	46
1.4. Influencia de la parcela y la variedad sobre el índice de madurez.....	50
2. Estudio metabólico de la evolución del contenido en ácidos orgánicos y azúcares. ....	52
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>69</b>



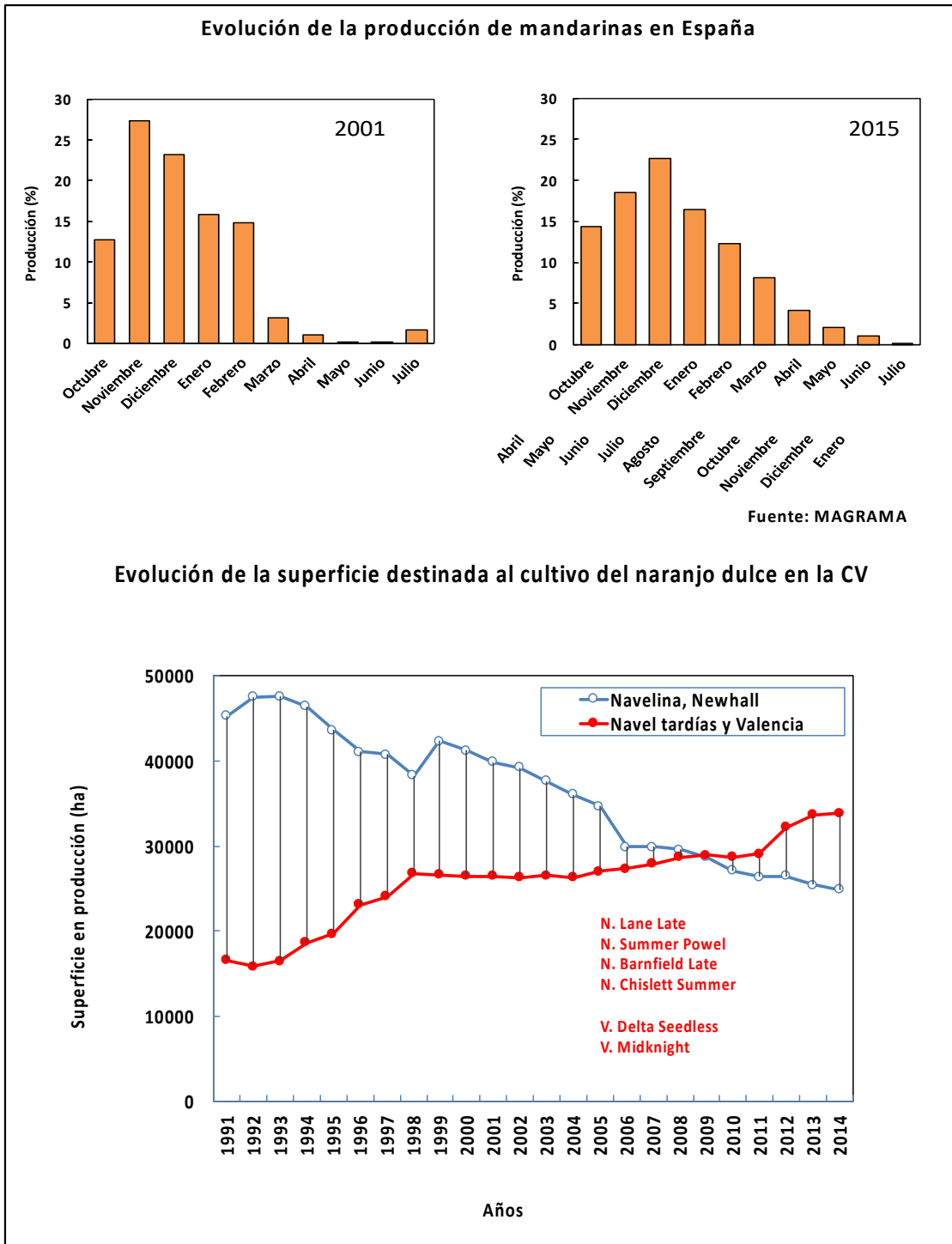
# **INTRODUCCIÓN**





Los cítricos son el principal cultivo frutal del mundo, con una producción de casi 146 millones de toneladas en 2016 (FAOSTAT, 2016). Las naranjas son los cítricos más cultivados (56% de la producción), seguidos de mandarinas (17%), limones y limas (12%), pomelos (10%) y otros cítricos (6%). Las naranjas solo son superadas en producción por las bananas y ligeramente por las manzanas. España es el principal productor de cítricos de la Unión Europea y séptimo en el mundo, por detrás de China, Brasil, Estados Unidos, India y México con una producción anual de más de 7 Mt para consumo en fresco, siendo la Comunidad Valencia la principal región productora, con una fuerte vocación exportadora, que convierte a España en el primer país exportador de cítricos del mundo.

La calidad organoléptica y características de sabor son cruciales en las especies de cítricos cultivadas en España, siendo de vital importancia a este respecto la relación entre ácidos orgánicos y azúcares en la etapa de maduración. Estos valores varían según especies, variedades y condiciones ambientales (Turcker et al., 1993). La búsqueda de nuevas variedades de cítricos pretende adecuar el mapa varietal de recolección y comercialización a las necesidades del mercado, a la vez que adaptarse a las exigencias organolépticas del consumidor. En particular, en España, se pretende reducir el exceso de oferta de los meses de noviembre y diciembre, ampliando la producción con mandarinas y naranjas más precoces y tardías (Figura 1). En el sector de las mandarinas, la producción de variedades precoces y tardías ha aumentado significativamente en los últimos 15 años. Entre las naranjas, la producción de variedades tardías ha aumentado hasta el punto de superar a la variedad más precoz de nuestro mercado, es decir, la Navelina. Sin embargo, no existen por el momento otras variedades de naranjas capaces de anticipar la recolección de la Navelina. Recientemente, se ha introducido la variedad M7, mutación espontánea de Navelina aparecida en Australia en 2004. En ese país, una de las características que se le atribuye es la de la precocidad en relación a Navelina. Sin embargo, no existen estudios al respecto y se desconoce, además, su adaptación fisiológica y agronómica al clima Mediterráneo.



**Figura 1.** Cambios en la producción de frutos cítricos de maduración precoz y tardía en los grupos de mandarina (A) y naranja (B). Fuente: elaboración propia a partir de datos del MAGRAMA y la GVA.

## 1. LA MADURACIÓN DE LOS CÍTRICOS

La curva de crecimiento del fruto sigue una tendencia sigmoideal, que se ha dividido en tres fases: una primera caracterizada por la división celular (fase I), seguida por un período determinado, básicamente, por el aumento del volumen celular, en la que el fruto incrementa notablemente su tamaño (fase II), y finalmente la fase III en la que se ralentiza el crecimiento y comienza el proceso de maduración (Bain, 1958). Durante la fase III se dan una serie de cambios, algunos de los cuales afectan a la corteza y son los responsables de la maduración externa, y otros afectan a las características del zumo y condicionan la maduración interna. Así, la maduración consiste en un conjunto de cambios físicos y bioquímico externos, de color y de aroma, e internos, de sabor, y de textura que el fruto experimenta cuando finaliza su crecimiento.

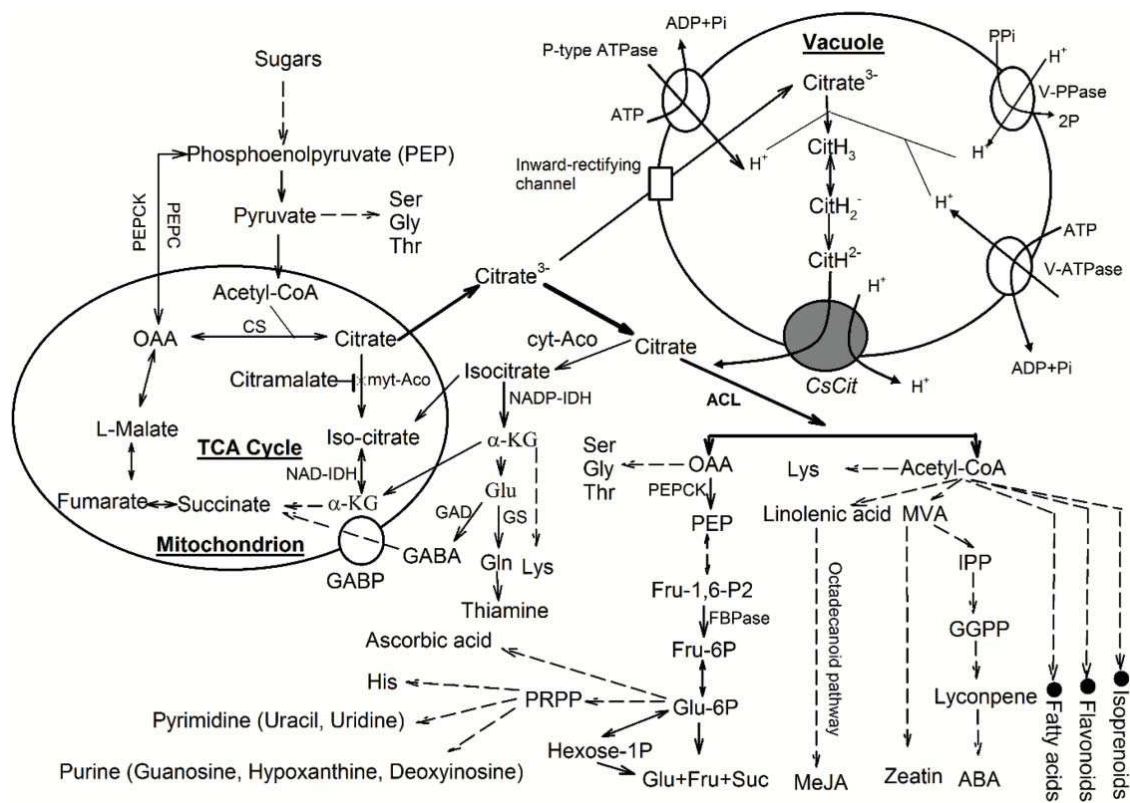
La maduración externa de los cítricos se define básicamente por el cambio de color del exocarpo como resultado de la disminución de los pigmentos verdes y el aumento de los pigmentos amarillo-rojizos. En frutos de naranja maduros, las xantofilas son los carotenoides más abundantes que pueden representar hasta el 98% de los carotenoides totales en el flavedo de algunos cultivares (Rodrigo et al. 2004). Dentro de estos compuestos, la violaxantina es el carotenoide predominante y puede alcanzar hasta el 80% de los carotenoides totales de la piel. El isómero 9-cis de violaxantina, predomina en las frutas maduras, y al ser las violaxantinas precursores de las tonalidades amarillentas, es poco probable que sea el único o principal carotenoide responsable de la intensa coloración naranja de algunas variedades (Kato et al., 2004; Rodrigo et al., 2004; Meléndez, Martínez et al. 2007). Algunos estudios han indicado que la relación entre los carotenoides amarillos y anaranjados (como cryptoxantina y citraurina) puede ser un mejor indicador típico de la coloración de las naranjas y mandarinas (Oberholster et al., 2001).

La maduración interna de los cítricos está relacionada, principalmente, con el aumento de la acumulación de carbohidratos y la reducción de la concentración de ácidos. Los cítricos acumulan la mayor parte de su sacarosa en las células de las vesículas de zumo (Soule et al., 1986). La concentración de carbohidratos, fundamentalmente sacarosa, glucosa y fructosa es máxima al final del periodo de maduración (Iglesias et al., 2007). Como ácido principal presente en los cítricos, el ácido cítrico aporta más del 90%

del contenido total de ácido orgánico. Su nivel máximo de concentración se encuentra en el primer tercio de la fase de crecimiento lineal del fruto. Desde ese momento hasta la maduración, la reducción de dicha concentración permite alcanzar las características de madurez de cada variedad. Las condiciones de cultivo y ambientales modifican la reducción de la acidez, influyendo directamente en la calidad del fruto (Iglesias et al., 2007).

### **1.1. Metabolismo de ácidos. El ácido cítrico.**

La respiración se compone de un conjunto de reacciones mediante las que los carbohidratos son oxidados a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, y la energía liberada es transformada en ATP (Ribas-Carbó et al., 2008). Dichas reacciones son la glucólisis, la oxidación de las pentosas fosfato, la β-oxidación de los ácidos grasos, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA o ciclo de Krebs), la oxidación del poder reductor (NADH) por la cadena respiratorio mitocondrial, y la fosforilación oxidativa. A partir de la degradación de almidón y sacarosa se obtiene fructosa 1,6-bifosfato. Ésta, a través de la vía glucolítica, se oxida hasta piruvato. El piruvato, a su vez, entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, produciendo NADH, ATP y CO<sub>2</sub>. Es en esta etapa, que sucede en la mitocondria, donde se sintetiza el ácido cítrico. Finalmente, el NADH se oxida en la cadena de transporte electrónico para producir ATP (Ribas-Carbó et al., 2008).



**Figura 1.** Modelo integral del metabolismo de citrato en los cítricos, adaptado de Guo et al. (2016). Las abreviaturas de las enzimas son: PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; PEP, fosfoenolpiruvato; CS, citrato sintasa; ACO, aconitasa; NAD-IDH, NAD-isocitrato deshidrogenasa; NADP-IDH, deshidrogenasa NADP-isocitrato; un- KG, un- cetoglutarato; ACL, ATP-citrato liasa; GAD, glutamato descarboxilasa; GABP, GABA permeasa.

### 1.1.1. Biosíntesis del ácido cítrico. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA)

El TCA, se inicia cuando la enzima citrato sintasa (CS) cataliza la condensación de oxaloacetato (OAA) y acetil-CoA para producir citrato (*Figura 1*). Durante la degradación glucolítica de la sacarosa, la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) cataliza la β-carboxilación de fosfoenolpiruvato (PEP) para producir oxaloacetato (OAA), que sirve como intermediario en el ciclo (Perotti et al., 2010). Por lo tanto, se considera que las enzimas CS y PEPC promueven la biosíntesis de citrato (Guo et al., 2016; Lin et al., 2016). Pero la actividad de los genes que codifican algunas de las enzimas clave en la síntesis de ácido cítrico, especialmente la CS, aconitasa deshidrogenasa (ACO) y NADP-isocitrato deshidrogenasa (NADP-IDH) (Sadka et al., 2000), no puede explicar completamente la variación en la concentración celular de ácido cítrico (Katz, et al.,

2007), que puede depender de diferentes vías metabólicas reguladas de manera coordinada por varias enzimas (Cercós et al., 2006; Terol et al., 2010).

Algunos ejemplos recientes son los estudios de Chen et al. (2013) y Guo et al. (2016). Estos autores estudiaron la expresión de genes que codifican PEPC y CS en cultivares de naranja navel con alto y bajo índice de acidez. En éstos, la actividad de CS no correlaciona de modo significativo con la concentración de ácido cítrico durante el desarrollo del fruto y la maduración. Otros estudios realizados en la mandarina Ponkan (Chen et al. 2012) y la mandarina Satsuma (Lin et al., 2015) proporcionaron resultados que apoyan la conclusión de que el aumento en la actividad de la enzima CS no induce aumentos significativos en la acumulación de citrato en la célula.

### ***1.1.2. Degradación del citrato en el citosol***

La enzima NADP-IDH regula otros procesos metabólicos como la descarboxilación del glutamato en aminobutirato (GABA) por medio de la enzima GAD (glutamato descarboxidasa). Liu et al (2014) han identificado que un incremento de la transcripción de los genes que codifican GAD (*CsGAD1* y *CsGAD2*) conlleva una reducción de acidez por consumo de citrato en el citosol. Además, el citrato también puede ser un sustrato en el citosol para ACL (ATP-citrato liasa). La ACL contribuye a la degradación de citrato a oxalacetato y acetil-CoA promoviendo la biosíntesis de metabolitos secundarios.

### ***1.1.3. Homeostasis ácida durante el desarrollo del fruto. Almacenamiento de ácidos en la vacuola.***

Todos estos estudios sobre las regulaciones enzimáticas y de biosíntesis de ácido cítrico en relación al nivel de acidez del fruto, sugieren que el almacenamiento en las vacuolas de ácido cítrico es el factor determinante que determinará su acidez final (Chen et al., 2013; Lin et al., 2015; Lu et al., 2016). El almacenamiento vacuolar y la degradación citosólica tienen fuertes conexiones entre sí. Guo et al., 2016, concluyó que la reducción de la absorción vacuolar de ácido cítrico por descenso en la actividad de la bomba de protones conduce a los mayores niveles de expresión de varios genes asociados con vías de biosíntesis de aminoácidos, tales como GABA, valina, y las vías de tirosina,

favoreciendo el catabolismo de otros compuestos como flavonoides, licopeno, y demás ácidos mostrados en la *Figura 1*.

Es importante destacar el papel del ácido cítrico en la vacuola para entender las diferencias en la acidez de la fruta en diferentes cultivares (ver apartado 3), y el mecanismo de regulación de inclusión y exclusión de este ácido en la vacuola. El elevado contenido en ácido cítrico de las vacuolas de las células vegetales depende de la regulación de las bombas de protones de las membranas de los orgánulos celulares (Oleski et al., 1987; Rentsch y Martinoia, 1991; Brune y otros, 1998). En plantas, se han caracterizado tres tipos de bombas de protones: vacuolar  $H^+$ -ATPasa (V-ATPasa), vacuolar  $H^+$ -pirofosfatasa (V-PPasa) y membrana plasmática  $H^+$ -ATPasa (ATPasa de tipo P) (Gaxiola et al., 2007). El estudio de estas tres bombas de protones en los cítricos, demuestra que contribuyen significativamente a la acidificación de la vacuola (Li et al., 2015; Shi et al., 2015; Guo et al., 2016; Li et al., 2016), lo que sugiere que la diferencia de acidez entre especies está vinculada a las diferencias en la actividad de sus bombas de protones. Un ejemplo de ello es el estudio de Guo et al. (2016), que relacionaron la expresión de la V-PPasa con la acidez los 2 cultivares de naranjo, 'Hong Anliu' (menor acidez) y 'Anliu' (acidez más elevada).

## **1.2. Metabolismo de azúcares**

El contenido en Sólidos Solubles Totales (SST) determina el estado de maduración de los frutos. Los SST están compuestos, mayoritariamente por azúcares, entre los que destacan la sacarosa, la glucosa y la fructosa. La sacarosa, compuesta por una molécula de glucosa y una de fructosa, es el producto fotosintético más usado para el transporte de carbohidratos a través de la planta y puede ser degradada a glucosa y fructosa mediante la invertasa o UDP-glucosa y fructosa, en el citosol por medio de la sacarosa sintetasa (Ribas-Carbó et al., 2008). Mediante la glucólisis se oxidan las hexosas procedentes de la hidrólisis de la sacarosa para generar ATP y piruvato, aunque esta ruta también puede funcionar al revés generando hexosas a partir de compuestos de bajo peso molecular en un proceso dependiente de energía llamado gluconeogénesis.

Las hexosas son fosforiladas por la hexoquinasa y la fructoquinasa para ser posteriormente catabolizadas en la glucólisis. Estas enzimas formarán glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato, respectivamente. La glucosa 6-fosfato se transforma en fructosa 6-

fosfato mediante la enzima glucosa 6-fosfato isomerasa, que cataliza reversiblemente la reacción. La fructosa 6-fosfato se fosforila a fructosa 1,6-bifosfato por la acción de dos enzimas diferentes: la fosfofructoquinasa, enzima que se inhibe en presencia de la fosfoenolpiruvato y que cataliza la reacción de manera irreversible y la fosfofructofosfotransferasa cuya acción es reversible (Dennis y Blakeley, 2000).

La fructosa 1-6bifosfato es el sustrato de ruta metabólica conocida como la ruta de las pentosas fosfato, cuyo producto final es el piruvato, por la fosforilación de fosfoenolpiruvato por la enzima piruvato quinasa. También se puede convertir el fosfoenolpiruvato en oxalacetato por la acción de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa. La malato deshidrogenasa citosólica reduce el oxalacetato produciendo malato. Además, la enzima málica dependiente de NADP<sup>+</sup> ubicada en el citosol cataliza la reacción reversible del malato a piruvato (Wheeler et al., 2008).

Estudios realizados por Chollet, et al. (1996) y Plaxton (1996) indican que la ruta utilizada por fosfoenolpiruvato carboxidasa, la malato deshidrogenasa citosólica y la enzima málica dependiente de NADP para sintetizar piruvato sin el precursor de la piruvato quinasa juega un papel importante en el aporte de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

## **2. INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN LA MADURACIÓN INTERNA DE LOS FRUTOS CÍTRICOS**

Los factores ambientales, principalmente la temperatura y el estado hídrico, regulan el metabolismo de los ácidos orgánicos y, por tanto la acidez. Su relación con los SST, en ocasiones, es confusa.

El efecto de la temperatura sobre el contenido en ácido cítrico no ha sido ampliamente estudiado. Reuther (1973) estableció que cuanto más alto es el régimen térmico día/noche, más baja es la concentración de ácidos, atribuyendo el descenso de la acidez a la rápida respiración de los ácidos orgánicos. El estudio se realizó bajo condiciones ambientales controladas y con temperaturas que marcan límites de actividad fisiológica del fruto. Los resultados muestran que a mayor rango de temperatura menor concentración de ácido cítrico (Agustí et al., 2003). En particular, la reducción de la acidez por efecto de la temperatura es por una reducción de la concentración de malato y



citrato (Kliwer, 1973; Ruffner, 1982; Wang y Camp, 2000; Gautier et al., 2005), ya que se modifica la actividad de las enzimas que contribuyen a la glucólisis y el ciclo de TCA, afectando a los niveles de ácidos orgánicos (Kliwer, 1973; Ruffner, 1982; Wang y Camp, 2000; Gautier et al., 2005). Por otra parte, la elevada temperatura es una variable clave para limitar la actividad de las bombas de protones y, por lo tanto, la difusión de aniones orgánicos en la vacuola (Lakso y Kliwer, 1975; Araujo et al., 2012). Las altas temperaturas pueden inducir un aumento en la permeabilidad en la membrana que se traduce en un aumento de la fuga de protones o formas protonadas de ácidos orgánicos. Este incremento de la permeabilidad explica la mayor actividad de las bombas de protones vacuolares en respuesta a un aumento de la temperatura (Terrier et al., 1998). El aumento en la actividad de las bombas de protones puede compensar la fuga de solutos (Terrier et al., 2001), pero solo parcialmente, lo que resulta en un reflujo neto de ácido málico y cítrico en el citosol donde se degradan aún más para mantener el pH del citosol, que conduce a una disminución de la acidez.

Por el contrario, Lin et al. (2016) observaron un aumento del contenido citrato en el mandarino 'Ponkan' cultivado a baja temperatura, debido al estímulo de la expresión de genes asociados con la síntesis de citrato en detrimento de genes que regulan su degradación.

El ácido cítrico realiza un papel importante de respuesta al estrés hídrico como un compuesto osmótico. De hecho, muchos investigadores han encontrado que el nivel de ácido cítrico aumenta en diferentes cultivares de cítricos durante periodos de estrés (Ginestar y Castel, 1996 ; Yakushiji et al., 1996 ; Lez-Altozano y Castel, 1999 ; Romero et al., 2006 ; Treeby et al., 2007 ; PAG Erez-P Erez et al., 2009 ; García y Tejero et al., 2010 ; Kallsen et al., 2011 ; Jiang et al., 2014 ; Zhang y Xie, 2014 ). De modo general, estos estudios sugieren que ante un estrés hídrico los frutos maduros tienden a aumentar el contenido de ácido orgánico y ácidos valorables a través de un simple efecto de dilución-deshidratación (Lez-Altozano y Castel, 1999). Otro mecanismo asociado con el estado hídrico de la planta que interfiere con la acidez del fruto es el ajuste osmótico: durante el periodo de estrés, todos los tejidos vegetales acumulan solutos principalmente azúcares y ácidos orgánicos para reducir su potencial osmótico y evitar una caída en la presión de turgencia celular (Hummel et al., 2010). Recientemente, Zhang y Xie (2014) estudiaron el efecto del estrés hídrico (-40% de riego) en el metabolismo de ácidos del

mandarino Ponkan. En las condiciones de su experimento, los niveles de expresión de los genes de degradación de citrato (ACO y GAD) fueron relativamente bajos, y los niveles de expresión de genes síntesis de citrato (CS) fueron relativamente altos. Estos cambios en la expresión génica pueden proporcionar una explicación para la acumulación de ácido cítrico durante el estrés hídrico.

La influencia de la temperatura en el contenido de los SST no está tan clara. En la mandarina Satsuma, de forma generalizada, la concentración de SST desciende con el incremento del régimen térmico, pero si se modifica sólo la temperatura nocturna, los mayores contenidos en SST se dan para temperaturas nocturnas intermedias. Además, para distintas combinaciones de temperaturas día/noche en el rango entre 15-30°C (durante el mes de octubre), los mayores contenidos en SST se dan con un régimen de temperaturas intermedias (Agustí et al., 2003). La concentración de SST también se ha relacionado con la temperatura de las raíces. En variedades de naranjo dulce como la Navelina y Valencia Late, temperaturas del suelo en torno a 25°C, dan lugar a contenidos más bajos de SST que con temperaturas en torno a los 19°C. Estos resultados apoyan lo ensayos que correlacionan suelos arenosos con menores concentraciones de SST, dado que tienen menor calor específico, y por ello más facilidad para calentarse que los suelos arcillosos (Agustí et al., 2003). Todo ello debe estar relacionado con el estado hídrico de la planta y su relación con el ambiente. Por ello, el contenido en sólidos solubles totales (SST) de los frutos se ve disminuido por el aumento de las lluvias acontecidas en los dos meses anteriores a su recolección (Agustí, 2003).

## **OBJETIVOS**



El objetivo general de este TFM es determinar la relación entre las condiciones ambientales y el metabolismo de los azúcares y los ácidos durante la maduración de las variedades ‘M7’ (mutación) y Navelina (parental) de naranjo dulce.

Para ello, se establecen los siguientes objetivos parciales:

1. Determinar la evolución de la acidez y el contenido en SST de los frutos de ‘M7’ y ‘Navelina’ en 5 fincas (Huelva, Córdoba, Orihuela, Godelleta, Rafelguaraf) con marcadas diferencias ambientales.
2. Estudiar el metabolismo de los ácidos orgánicos y azúcares y su relación con las condiciones ambientales y la variedad.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**





## 1. MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL

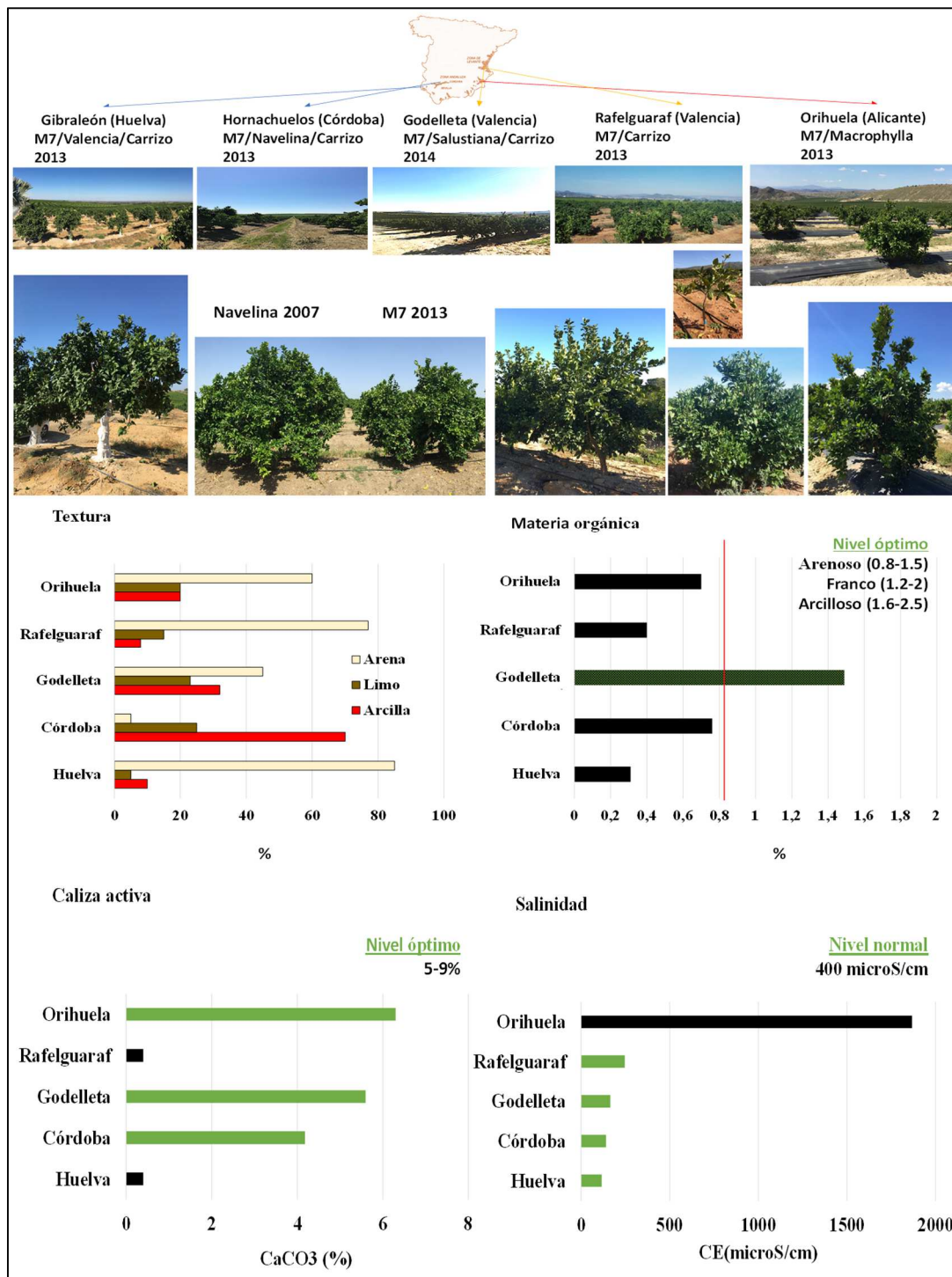
Los experimentos se realizaron con árboles adultos de naranjo dulce (*Citrus sinensis*) cvs. ‘Navelina’ y ‘M7’. El cv. ‘M7’ es una reciente mutación espontánea de ‘Navelina’ surgida en Australia (2004) caracterizada por su mayor precocidad en la maduración del fruto que permite un adelanto de la recolección.

Con el fin de establecer el máximo posible de variabilidad en cuanto a la maduración interna del fruto, se seleccionaron 5 fincas que dispusieran, a la vez, las 2 variedades, con amplias diferencias climáticas y de suelo. Éstas se localizaban en Godelleta (Valencia), Rafelguaraf (Valencia), Orihuela (Alicante), Hornachuelos (Córdoba) y Gibraleón (Huelva) (Figura 3A). El patrón utilizado en todas las fincas es el citrange Carrizo, a excepción de la finca de Orihuela, en la que los árboles están injertados en *Citrus macrophylla*. Las 5 fincas presentan riego localizado, y se cultivan según la normativa de Producción Integrada de cítricos, atendiendo a las decisiones del personal técnico de cada una.

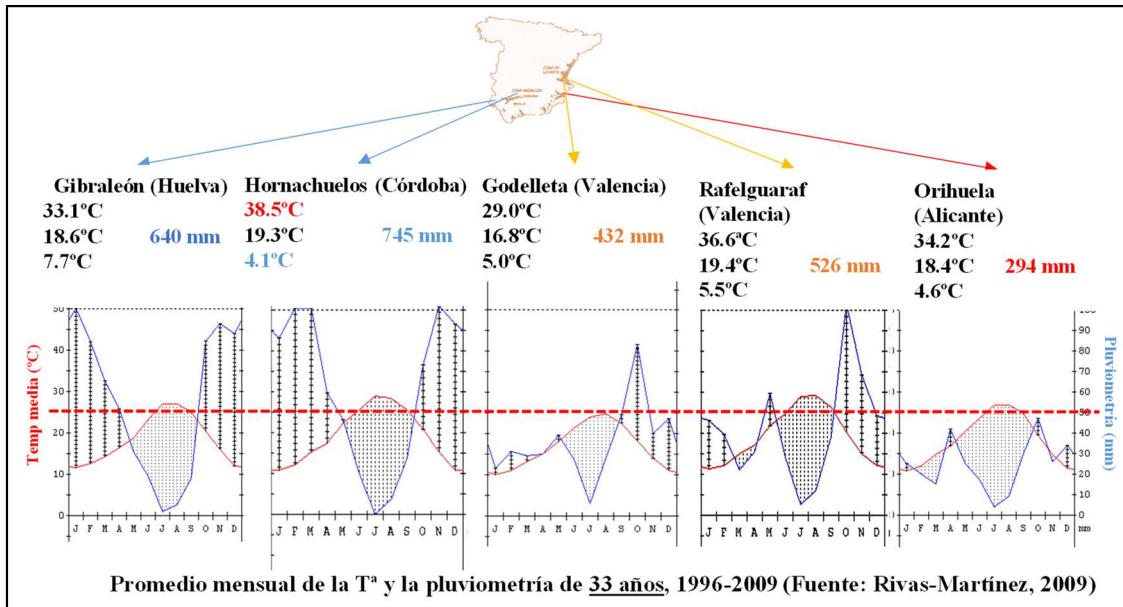
Las diferencias entre las fincas se basan en las características físicas y químicas del suelo y las condiciones ambientales. La textura del suelo es arcillosa en Córdoba, franco-arcillosa en Godelleta, franco-arcilloso-arenosa en Orihuela, y franco-arenosa- en Gibraleón y Rafelguaraf. Los porcentajes de arena, limo y arcilla se muestran en la figura 3B. El porcentaje de materia orgánica es deficiente en todas las fincas excepto en Godelleta (Figura 3C), el nivel de caliza activa es bajo-medio en todas las fincas (Figura 3D), y el nivel de salinidad es extremadamente alto en Orihuela (Figura 3E). Las características climáticas promedio (periodo 1996-2009, según Rivas-Martínez et al., 2009) de cada una de las fincas se muestran en la Figura 4. Las 2 fincas de Andalucía presentan el mayor promedio pluviométrico anual (640 mm y 745 mm en Gibraleón y Hornachuelos), mientras que la finca de Orihuela presenta el promedio menor (294 mm). La finca de Hornachuelos presenta el mayor promedio de temperatura máxima (38,5 °C) y el menor de mínima (4,1 °C), mientras que la finca de Godelleta presenta el menor promedio de la temperatura máxima (29,0°C).

Los datos climáticos del periodo del estudio fueron extraídos de las estaciones meteorológicas públicas ([www.ivia.es](http://www.ivia.es); [www.juntadeandalucia.es](http://www.juntadeandalucia.es)) más próximas a las

parcelas de Godelleta, Rafelguaraf, Orihuela y Hornachuelos. Para la parcela de Gibraleón (Huelva), se utilizaron los datos de la estación meteorológica propia de la que dispone.



**Figura 3 A:** Localización de las 5 parcelas de estudio. Características climáticas periodo 1996-2009, en las cinco parcelas de estudio; **B:** textura; **C:** materia orgánica; **D:** caliza activa; **E:** salinidad.



**Figura 4.** Promedio mensual de la temperatura y la pluviometría de 13 años, 1996-2009 (Fuente: Rivas-Martínez, 2009).

Se seleccionaron 3 árboles de cada variedad en cada finca, de los que se muestreó fruta al azar entre los meses de septiembre y diciembre en cinco fechas de muestreo. En cada fecha de muestreo, se tomaron 15 frutos por árbol y variedad, que se procesaron como 3 repeticiones independientes.

De los frutos muestreados, se evaluaron las características externas e internas del fruto (color, peso fruto, peso del zumo, volumen, acidez, SST), y del zumo extraído se conservaron dos muestras a 4°C hasta su análisis metabólico.

## 1. MÉTODOS

### 2.1. Determinación de las características de la maduración del fruto

El color se determina mediante un colorímetro (Konica Minolta, CR-400). Se hacen tres mediciones de cada fruto y se hace la media. La función del colorímetro es describir la coloración del exocarpo. Para ello, establece tres parámetros, “L”, “a”, “b”, que representan, respectivamente, 1) la luminosidad, que varía entre 0 (negro) y 100 (blanco); 2) los colores verde (a<0) y rojo (a>0), y 3) los colores azul (b<0) y amarillo (b>0).

Para el cálculo de la acidez, se realizó una valoración por neutralización con NaOH 0,1 N., utilizando como indicador la solución alcohólica de fenolftaleína al 1%. Los cm<sup>3</sup> de esa solución de sosa gastados en la neutralización de 5 cm<sup>3</sup> de zumo, multiplicados por el factor 1,28, permiten expresar la acidez en % (Quinzá y López, 1978).

La medición de los SST (°Brix) se realizó mediante refractómetro digital (ATAGO, PR-1 BRIX-METER). Los refractómetros digitales son equipos portátiles que no dependen de la observación ocular. Una vez colocada una gota de la muestra sobre el prisma en 3 segundos se obtiene el resultado con una exactitud de un decimal. Se expresa por la relación entre los sólidos solubles totales (SST) y la acidez (A). Se determinó el peso de cada fruto con balanza (Mettler Toledo, PB8001-S) de error de un  $\pm 0.1$  unidades. Mediante un pie de rey toman las medidas de la altura (h) y el diámetro (d) de todos los frutos muestreados.

## ***2.2. Estudio metabolómico del zumo***

Para las parcelas situadas en Huelva y Córdoba, se procedió al estudio metabolómico del zumo, realizando un análisis de HPLC. El análisis de los metabolitos primarios se realizó en el Servicio de Metabolómica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC, Valencia, España) Metabolomics Platform.

El análisis de metabolitos primarios se realizó por derivatización seguida de GC-MS. Se mezclaron 0,1 y 5  $\mu$ L de zumo fresco con 3  $\mu$ L de estándar interno (0,2 mg / ml de ribitol en agua) y se redujeron a sequedad en un Speed-Vac, para cubrir un intervalo más amplio de abundancia de metabolitos.

Para la derivatización, los residuos secos se re-disolvieron en 40  $\mu$ L de hidrocloreuro de metoxiamina 20 mg / ml en piridina y se incubaron durante 90 min a 37 °C, seguido de la adición de 60  $\mu$ L MSTFA (N-metil-N- [trimetilsilil] trifluoroacetamida) y 6  $\mu$ L de una mezcla estándar de tiempo de retención (mezcla al 3,7% [p / v] de ésteres metílicos de ácidos grasos que varían de 8 a 24 ° C) y una incubación posterior durante 30 minutos a 37 ° C.

Se inyectaron volúmenes de muestra de 2  $\mu$ L en modo de 1/10 división en un cromatógrafo de gases 6890 N (Agilent Technologies Inc. Santa Clara, CA) acoplado a

un espectrómetro de masas Pegasus 4D TOF (LECO, St. Joseph, MI). La cromatografía de gases se realizó en una columna BPX35 (30 mx 0,32 mm x 0,25 m) (SGE Analytical Science Pty Ltd., Australia) con helio como gas portador, flujo constante 2 ml / min. El revestimiento se ajustó a 230 ° C. El programa del horno fue de 85 ° C durante 2 min, 8 ° C / min de rampa hasta 360 ° C. Los espectros de masas se recogieron a 6,25 espectros s-1 en el intervalo m / z 35-900 y energía de ionización de 70 eV. Los cromatogramas y los espectros de masas se evaluaron usando el programa CHROMATOF (LECO, St. Joseph, MI).

Para la cuantificación absoluta, los picos se compararon con los de los estándares externos y se realizó una curva estándar con estándares externos.

### **3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis estadístico de los datos empleó el programa Statgraphics Centurión XVI. Se realizó análisis de regresión y análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el test de Student para comprobar normalidad en la regresión. A los valores porcentuales se les aplicó la transformación  $\arcsin(\sqrt{p})$ . Se ha calculado el valor LSD para el estudio de la separación de medias.



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

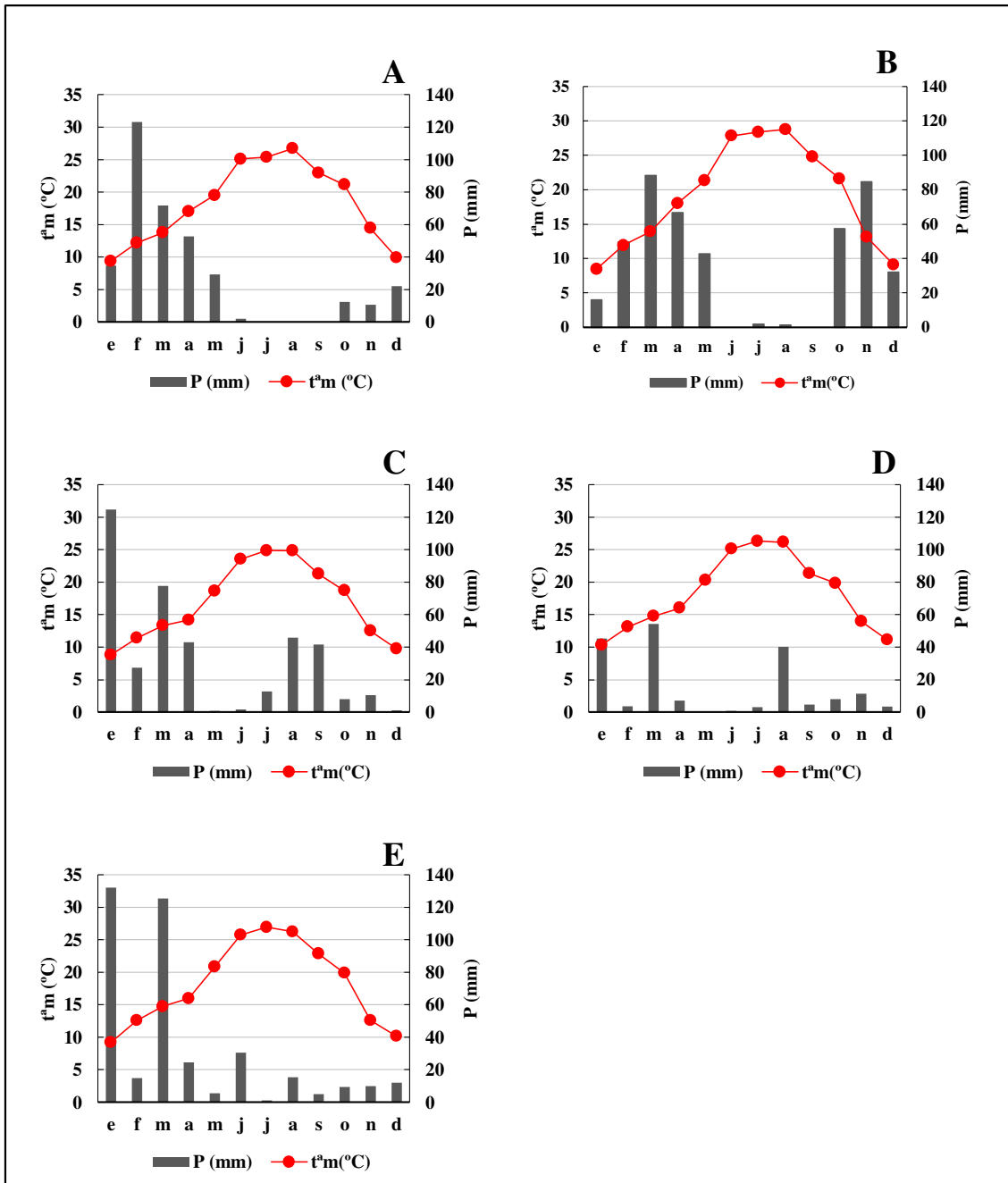




# **1. EFECTO DEL AMBIENTE Y LA VARIEDAD EN LA ACIDEZ Y CONTENIDO EN SST DEL FRUTO**

## **1.1. Condiciones ambientales**

La figura 5 resume las variaciones de temperatura media y precipitación del año 2017 en las 5 fincas. Las 2 fincas andaluzas mostraron una primavera más lluviosa que las tres fincas valencianas. Sin embargo, durante el periodo de crecimiento del fruto (julio-octubre) la precipitación fue más frecuente en las fincas de Valencia que en las de Andalucía. En cuanto a la temperatura media, las diferencias más importantes se establecieron a partir del mes de junio. Así, la finca más calurosa (Córdoba) registró valores de temperatura media cercanos a los 30°C entre junio y agosto, mientras que la finca de Godelleta no superó los 25°C de media (Figura 1). En las 5 fincas, la temperatura media descendió por debajo de los 15°C en el mes de noviembre, momento en el cual se alcanzó la maduración externa del fruto (datos no mostrados).

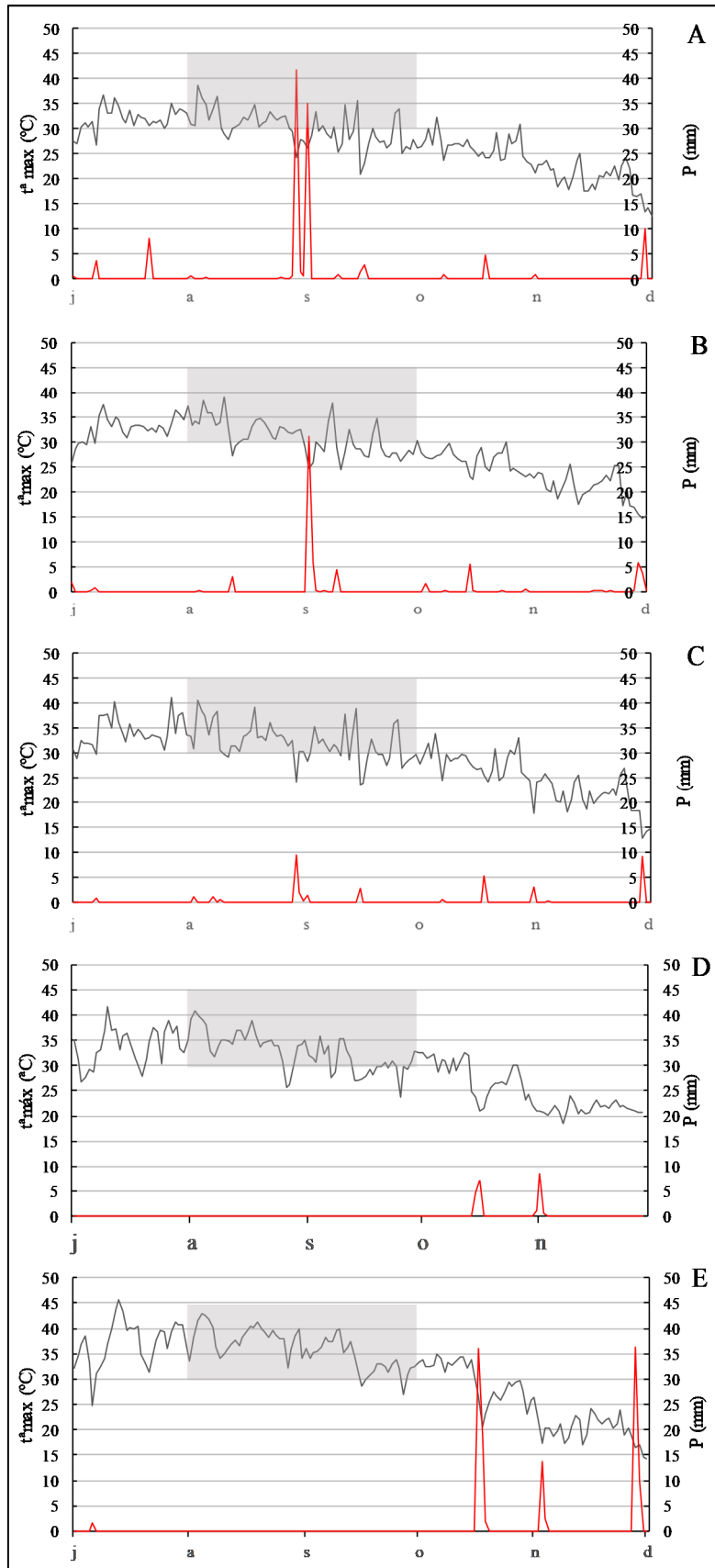


**Figura 5.** Climogramas de las 5 parcelas de estudio. A: Huelva; B: Córdoba; C: Godelleta (Valencia); D: Orihuela (Alicante); E: Rafelguaraf (Valencia).

Con el fin de establecer relaciones entre las condiciones ambientales y las características de maduración interna de los frutos de ‘M7’ y ‘Navelina’, se registró la temperatura mínima y máxima del día y la precipitación durante el periodo de crecimiento y maduración del fruto, es decir, entre julio y diciembre (*Figura 6*). La precipitación difirió significativamente entre las cinco fincas, de modo que mientras en las dos fincas de Andalucía no llovió en todo el verano y parte del otoño, en las tres fincas Valencianas

llovió entre 4 y 6 veces durante el verano, aunque con diferencias cuantitativas a finales del mes de agosto y principio del mes de septiembre. Esas lluvias, las de finales del verano, se han relacionado inversamente con el contenido en acidez y los SST (Agustí, 2004). En particular, las fincas de Godelleta, Orihuela y Rafelguaraf registraron una precipitación de 85 mm, 35mm y 13 mm, respectivamente, en tres días (Figura 6).

Por otra parte, las altas temperaturas durante la maduración se relacionan inversamente con el contenido en ácidos por un aumento de la respiración (Agustí, 2004). Pero las temperaturas extremadamente altas reducen la actividad en la planta, con lo que se desconocen los rangos de temperatura que más inciden sobre la reducción de ácidos en condiciones de campo. Por ello, se estudió con detalle la relación de la temperatura máxima del día con la acidez del fruto (ver apartados 1 y 2). En las 5 fincas estudiadas, la temperatura máxima mostró diferencias significativas, en particular en la finca de Córdoba, donde la temperatura máxima del día ha estado por encima de los 30°C durante 27 días en el mes de septiembre. En Rafelguaraf, Huelva y Orihuela se alcanzó esa temperatura en 15 días del mes, y 8 y 5 días en Godelleta y Orihuela, respectivamente. En el mes de octubre, las fincas de Huelva y Córdoba también fueron las más cálidas con 11 y 9 días por encima de 30°C, seguidas de Godelleta y Rafelguaraf con 2 días, y Orihuela con 1 día (Figura 6).



**Figura 6.** Registro de precipitaciones diarias (rojo) y temperatura máximas diarias (negro) en los meses de julio a diciembre. A: Godelleta; B: Orihuela; C: Rafelguaraf; D: Huelva; E: Córdoba. El cuadro gris indica el rango de temperatura en los meses de agosto y septiembre.

## 1.2. Influencia de la parcela y la variedad en la acidez del fruto

El análisis de la varianza de la acidez del fruto indica que no existen diferencias significativas entre la variedad original (Navelina) y su mutante (M7), pero sí entre las zonas de cultivo (*Tabla 1*).

**Tabla 1.** Análisis de la varianza de la acidez del fruto, en función de la finca (n=5) y la variedad (n=2). El análisis contempla todas las fechas de muestreo (4 en Rafelguaraf y 5 en el resto de fincas) y 3 repeticiones por fecha y variedad. En la finca de Godelleta no hay variedad Navelina. 1: Huelva; 2 Córdoba; 3: Godelleta; 4: Orihuela; 5: Rafelguaraf.

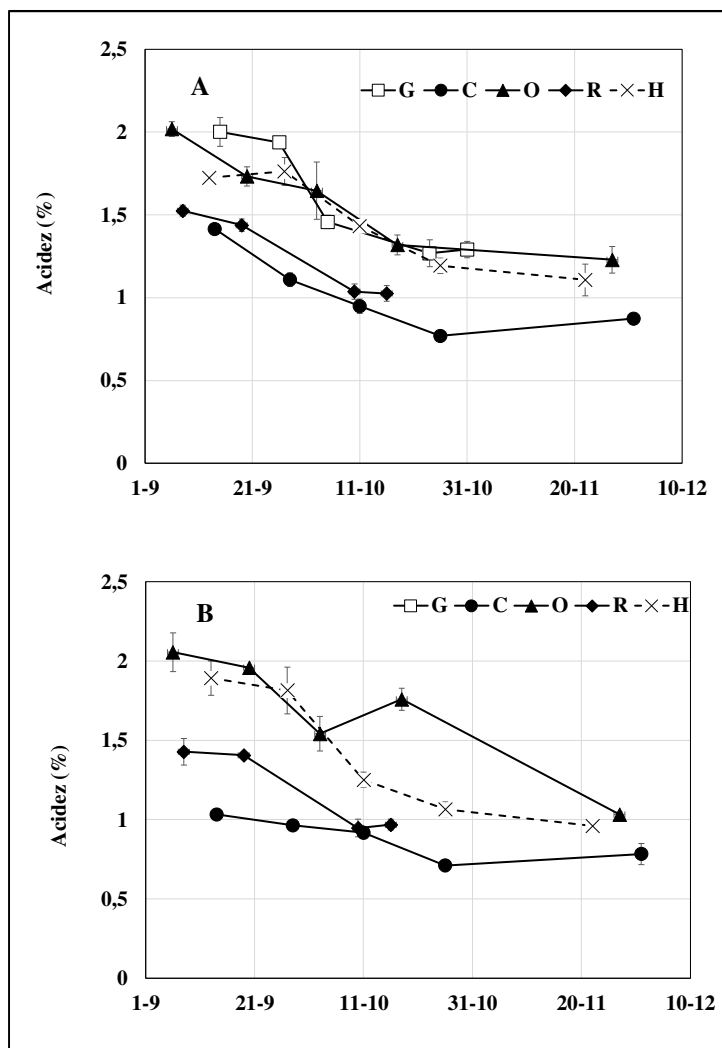
**Análisis de Varianza para Acidez - Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F
EFFECTOS PRINCIPALES				
A: Finca	8,59283	4	2,14821	20,70
B: Variedad	0,12656	1	0,12656	1,22
RESIDUOS	12,7645	123	0,103777	
TOTAL (CORREGIDO)	21,3621	128		

Fuente	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES	
A: Finca	0,0000
B: Variedad	0,2716
RESIDUOS	
TOTAL (CORREGIDO)	

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Las diferencias en la acidez del fruto entre fincas se observan ya en los primeros muestreos del mes de septiembre, cuando el fruto todavía se encuentra en el estado de coloración verde inmaduro, es decir, cuando no se ha iniciado la degradación de la clorofila ( $a = -14$ ). En ese momento, mientras en Córdoba y Rafelguaraf el valor de la acidez del fruto es próximo a 1,5 %, en Godelleta, Orihuela y Huelva, la acidez es significativamente superior, aproximándose al 2% (*Figura 7*). Esas diferencias se observan en las dos variedades, y se mantienen a lo largo del proceso de maduración del fruto. De este modo, en el momento de la recolección (última fecha de muestreo en cada finca), la acidez del fruto en las fincas de Córdoba y Rafelguaraf se situó por debajo de 1 mientras que en las fincas de Huelva, Godelleta y Orihuela la acidez fue mayor que 1 (*Figura 7*).



**Figura 7.** Evolución de la acidez del fruto de naranja M7 (A) y Navelina (B) en las fincas de Godolleta, Córdoba, Orihuela, Rafelguaraf y Huelva. Cada valor es la media de 3 repeticiones de 5 frutos cada una  $\pm$  ES.

### 1.3. Influencia de la parcela y la variedad en el contenido en SST del fruto

El análisis de la varianza del contenido en SST del fruto indica que existen diferencias significativas entre la variedad original (Navelina) y su mutante (M7) y también entre las zonas de cultivo (Tabla 2). El estudio de la separación de medias para el factor zona de cultivo indica que es únicamente la finca de Rafelguaraf la que mostró diferencias respecto del resto de fincas. Sin embargo, al representar la evolución del contenido en SST en función de las 5 fincas, no se observan esas diferencias en la variedad M7, pero sí en la variedad Navelina (Figura 8). El hecho de que la recolección en esa finca se realizara el 16 de octubre, entre 1 y 2 meses antes que el resto, impidió la

acumulación de azúcares en el fruto (SST<12) como en el resto de fincas (SST>13) (Figura 8) . Por tanto, resultaría imprudente atribuir a esa finca una influencia directa en la capacidad del fruto para acumular azúcar. La realización de un nuevo experimento evaluando el contenido en SST durante más tiempo permitiría resolver esta cuestión.

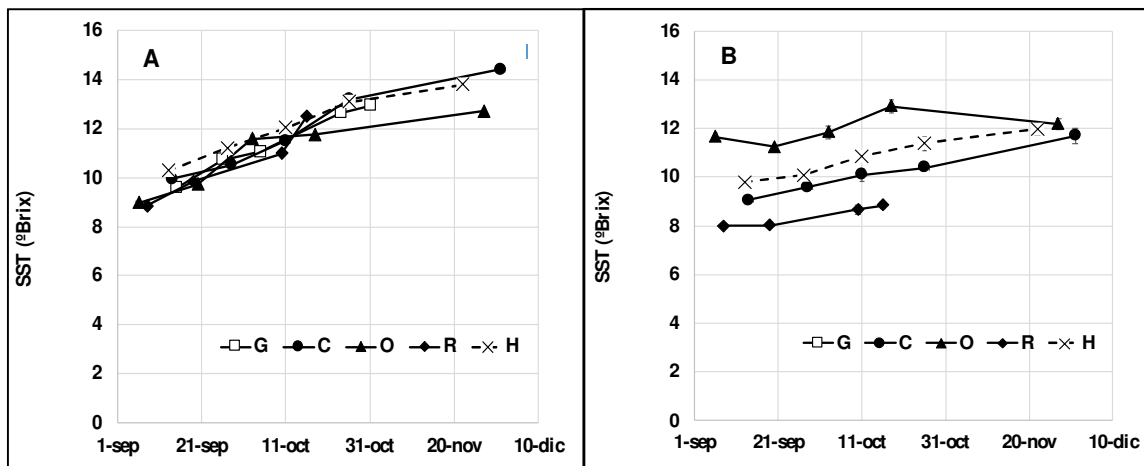
**Tabla 2.** Análisis de la varianza del contenido en SST del fruto, en función de la finca (n =5) y la variedad (n=2). El análisis contempla todas las fechas de muestreo (4 en Rafelguaraf y 5 en el resto de fincas) y 3 repeticiones por fecha y variedad. En la finca de Godelleta no hay variedad Navelina. 1: Huelva; 2 Córdoba; 3: Godelleta; 4: Orihuela; 5: Rafelguaraf.

**Análisis de Varianza para Brix\_anova - Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>				
A: Finca	22,1056	1	22,1056	12,45
B: Variedad	68,185	4	17,0462	9,60
RESIDUOS	218,335	123	1,77508	
TOTAL (CORREGIDO)	311,904	128		

Fuente	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>	
A: Finca	0,0006
B: Variedad	0,0000
RESIDUOS	
TOTAL (CORREGIDO)	

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual



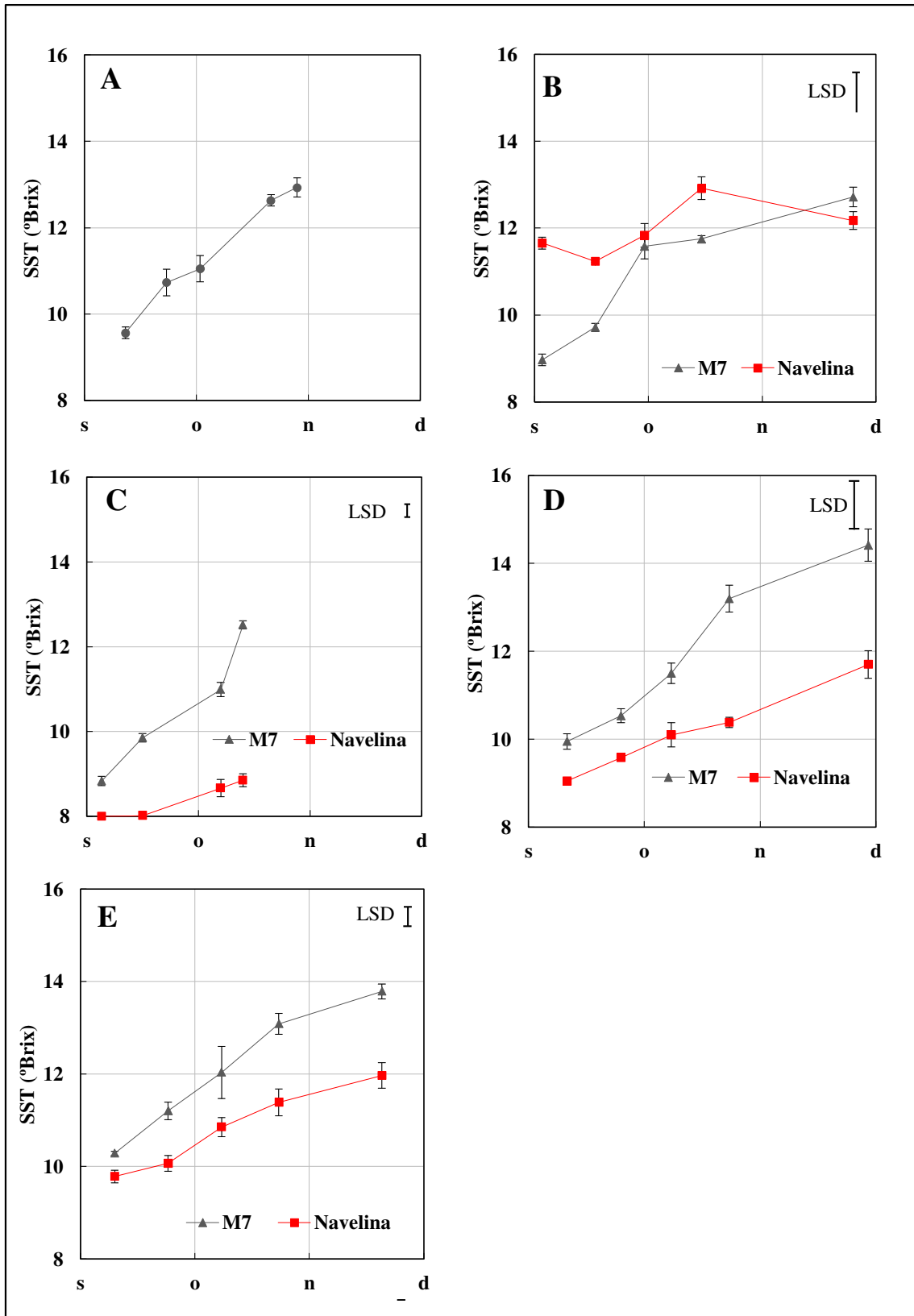
**Figura 8.** Evolución del contenido en SST del fruto de naranja M7 (A) y Navelina (B) en las fincas de Godelleta, Córdoba, Orihuela, Rafelguaraf y Huelva. Cada valor es la media de 3 repeticiones de 5 frutos cada una ± ES. Cuando el ES no se aprecia, el tamaño del símbolo es mayor que el error.

Por otra parte, la representación de la evolución del contenido en SST en función del factor variedad, no deja lugar a dudas de las diferencias entre éstas en las fincas de

Rafelguaraf, Córdoba y Huelva (Figura 9). Sin embargo, en la parcela de Orihuela la variedad M7 parte de valores más bajos en SST en los primeros muestreos que el parental Navelina, al contrario que en el resto de fincas. Además, no se obtienen diferencias significativas entre ambas especies en contenido de SST (Figura 9B).

Los valores iniciales para las parcelas de Rafelguaraf y Córdoba están comprendidos entre 8 y 10 °Brix, mientras que en Huelva las 2 variedades rondan los 10 °Brix. Los mayores niveles de SST para M7 en el momento de la recolección se dan en Córdoba y Huelva con valores en torno a los 14 ° Brix, mientras que para Navelina el mayor valor es el de la finca de Orihuela. Las diferencias en el último punto de muestreo más acusadas entre variedades se encuentran en las en las parcelas de Rafelguaraf y Córdoba, que dependieron únicamente de la fecha de recolección (Figura 9).





**Figura 9.** Comparación de la evolución del contenido en SST en las variedades M7 y Navelina. A: Godolleta; B: Orihuela, C: Rafelguaraf; D: Córdoba; E: Huelva. Cada valor es la media de 3 repeticiones de 5 frutos cada una  $\pm$  ES. Cuando el ES no se aprecia, el tamaño del símbolo es mayor que el error. La barra vertical indica el valor LSD.

#### 1.4. Influencia de la parcela y la variedad sobre el índice de madurez.

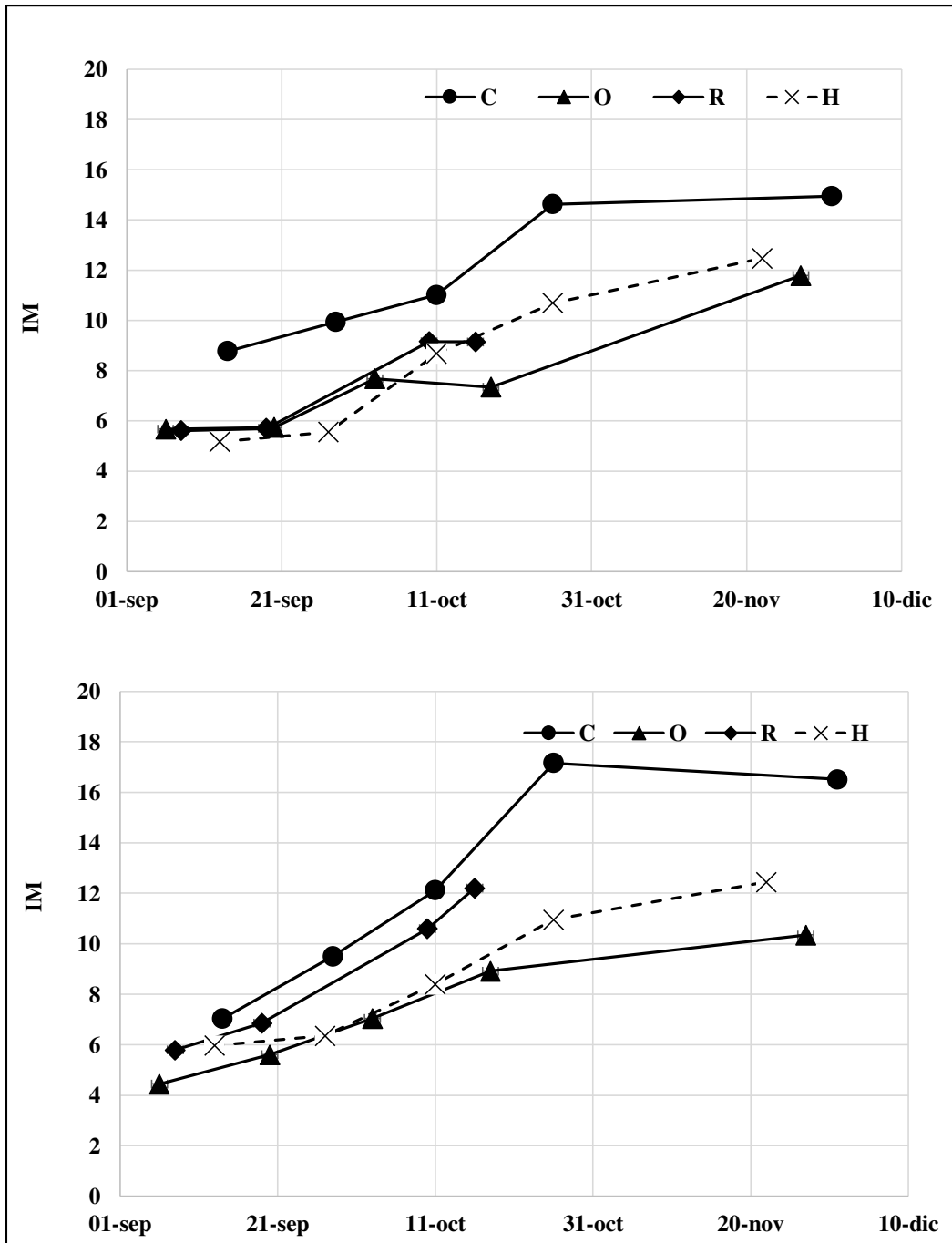
El análisis de la varianza del índice de madurez (IM), es decir, la relación entre SST y ácidos del fruto indica que existen diferencias significativas entre la variedad original (Navelina) y su mutante (M7) y entre las zonas de cultivo (*Tabla 3*). Además, la interacción entre las 2 variables también fue significativa, aunque solamente para la variedad Navelina en la finca de Rafelguaraf (datos no mostrados). La finca de Córdoba, que mostró la acidez más baja, también presentó el mayor índice de madurez (Figura 10), lo pone de manifiesto la gran importancia de la acidez en la maduración interna del fruto.

**Tabla 3.** Análisis de la varianza de índice de madurez del fruto, en función de la finca (n=5) y la variedad (n=2). El análisis contempla todas las fechas de muestreo (4 en Rafelguaraf y 5 en el resto de fincas) y 3 repeticiones por fecha y variedad. En la finca de Godelleta no hay variedad Navelina. 1: Huelva; 2 Córdoba; 3: Godelleta; 4: Orihuela; 5: Rafelguaraf.

**Análisis de Varianza para IM - Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Variedad	12,0929	1	12,0929	18,66	0,0001
B: Fecha	334,181	3	111,394	171,92	0,0000
C: Finca	280,086	3	93,362	144,09	0,0000
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	13,8897	3	4,6299	7,15	0,0003
AC	21,8007	3	7,26688	11,22	0,0000
BC	48,4337	9	5,38153	8,31	0,0000
RESIDUOS	45,3563	70	0,647947		
TOTAL (CORREGIDO)	846,132	92			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual



**Figura 10.** Evolución del índice de madurez del fruto de naranja Navelina (A) y M7 (B) en las fincas de Córdoba, Orihuela, Rafelguaraf y Huelva. Cada valor es la media de 3 repeticiones de 5 frutos cada una  $\pm$  ES. Cuando el ES no se aprecia, el tamaño del símbolo es mayor que el error.

## **2. ESTUDIO METABOLÓMICO DE LA EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN ÁCIDOS ORGÁNICOS Y AZÚCARES.**

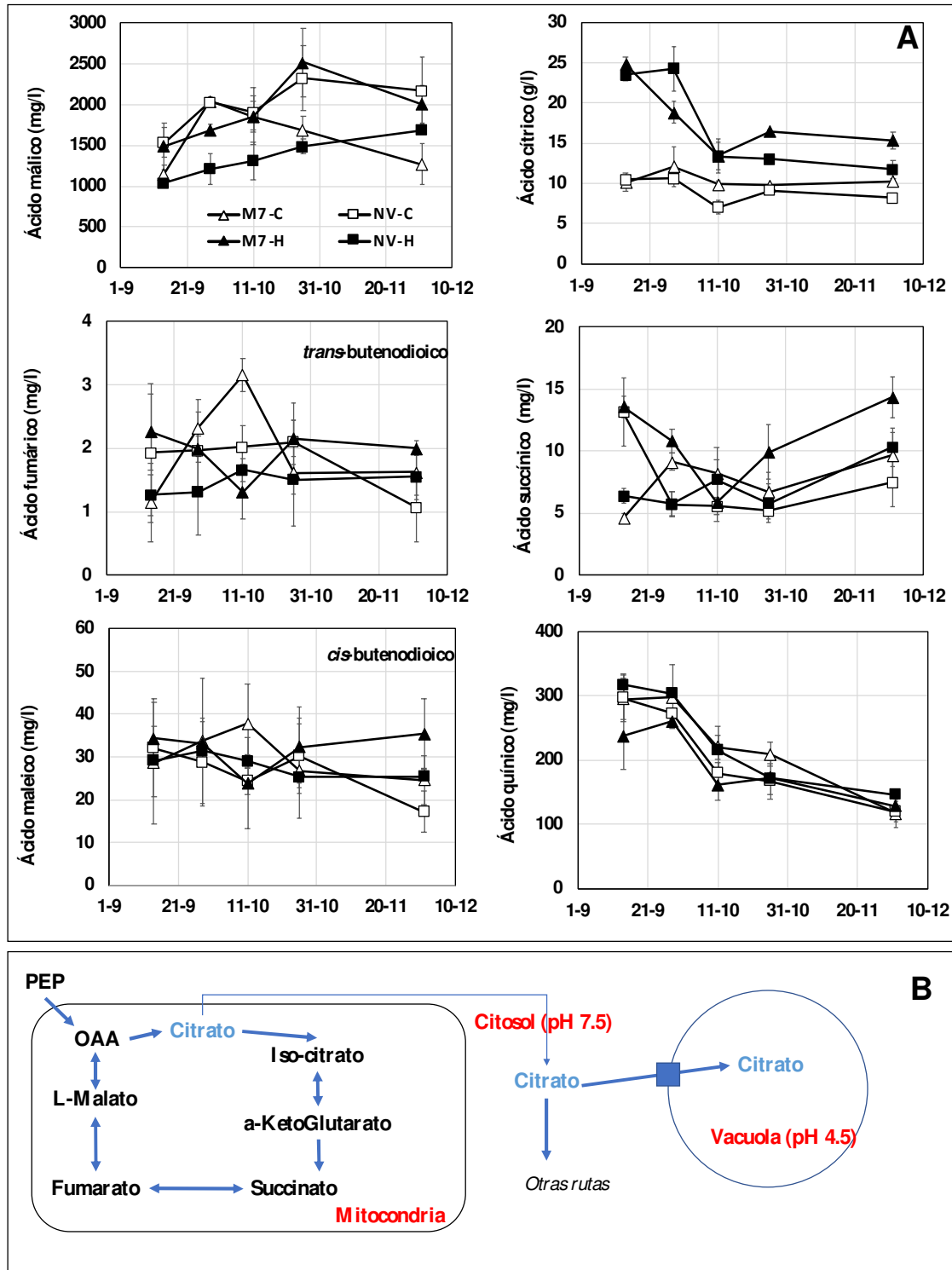
Con el fin de explicar desde el punto de vista metabólico la variación de la acidez (que dependió significativamente del ambiente) y los SST (que dependió significativamente de la variedad), se determinó el contenido de los principales ácidos del ciclo de Krebs (ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido fumárico y su precursor el ácido maleico), un ácido del metabolismo secundario, el ácido quínico (precursor de la síntesis de flavonoides y de aminoácidos secundarios) (Leuschner et al., 1995), y los carbohidratos sacarosa, glucosa y fructosa. Los análisis se realizaron en las muestras de Córdoba y Huelva, por su marcada diferencia en la acidez, su idéntico comportamiento en el contenido en SST entre variedades, y la ausencia de lluvia durante el verano y principio del otoño, que sugiere la escasa importancia del efecto de dilución en la maduración interna, y, por tanto, una variación por causas metabólicas.

El ANOVA correspondiente a la variación de cada uno de los metabolitos analizados indica que la concentración de los ácidos del ciclo de Krebs, es decir, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico y ácido fumárico (y su precursor el ácido maleico) no responden del mismo modo a los factores analizados (variedad, finca y fecha de muestreo) (Tabla 4). La concentración de ácido succínico varió significativamente en función de las 3 variables independientes, la concentración de ácido cítrico se modificó en función de la finca y la fecha de muestreo, la concentración de ácido málico lo hizo en función de la fecha, mientras que los ácidos fumárico y maleico no modificaron significativamente su concentración. Por su parte, la concentración del ácido quínico se modificó en función de la fecha de muestreo. Por el contrario, la concentración de carbohidratos respondió del mismo modo para todos ellos (sacarosa, glucosa y fructosa) en función de la variedad y la fecha de muestreo (Tabla 4).

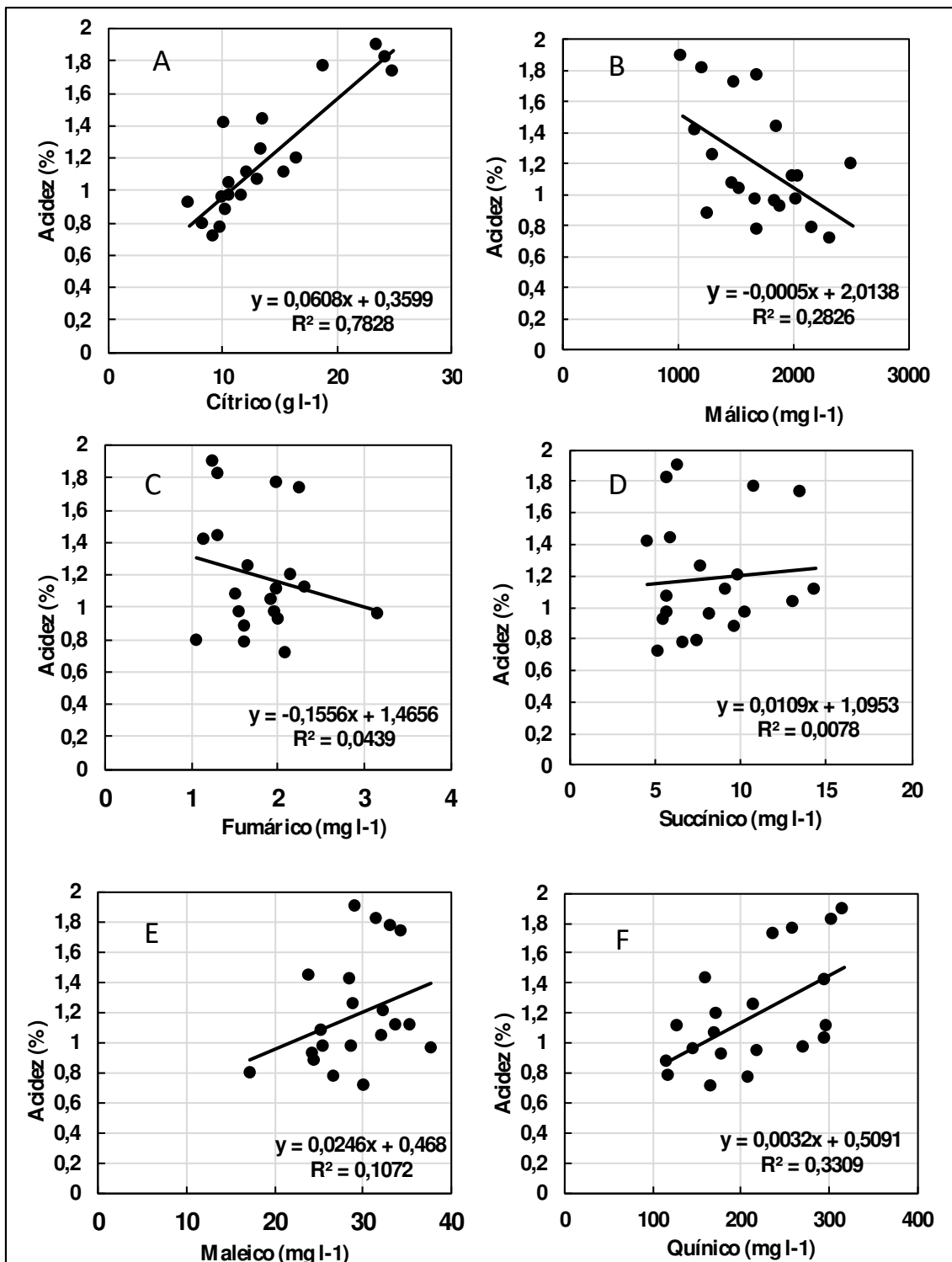
**Tabla 4.** Valores de significancia estadística resultantes de los ANOVAs de los metabolitos analizados en función de la finca (n =2), la variedad (n=2) y la fecha de muestreo (n=5). Se realizaron 3 repeticiones analíticas por cada fecha y variedad.

<b>Ácido cítrico</b>	<i>Valor-P</i>	<b>Ácido succínico</b>	<i>Valor-P</i>	<b>Ácido fumárico</b>	<i>Valor-P</i>
A: Variedad	0,3618	A: Ambiente	<b>0,0294</b>	A: Variedad	0,1706
B: Ambiente	<b>0,0000</b>	B: Variedad	<b>0,0049</b>	B: Ambiente	0,4066
C: Fecha	<b>0,0000</b>	C: Fecha	<b>0,0041</b>	C: Fecha	0,6940
Interacciones		Interacciones		Interacciones	
	AB 0,3158		AB <b>0,0132</b>		AB 0,4819
	AC 0,3909		AC 0,4537		AC 0,9516
	BC 0,1195		BC 0,1328		BC 0,2393
	ABC 0,2475		ABC <b>0,0006</b>		ABC 0,2240
<b>Ácido málico</b>	<i>Valor-P</i>	<b>Ácido maleico</b>	<i>Valor-P</i>	<b>Ácido quínico</b>	<i>Valor-P</i>
A: Variedad	0,4103	A: Variedad	0,3402	A: Variedad	0,4321
B: Ambiente	0,1947	B: Ambiente	0,6968	B: Ambiente	0,5921
C: Fecha	<b>0,0087</b>	C: Fecha	0,8730	C: Fecha	<b>0,0000</b>
Interacciones		Interacciones		Interacciones	
	AB 0,0000		AB 0,9979		AB <b>0,0130</b>
	AC 0,4403		AC 0,9738		AC 0,5641
	BC 0,2400		BC 0,8452		BC 0,8351
	ABC 0,3634		ABC 0,7695		ABC 0,8211
<b>Glucosa</b>	<i>Valor-P</i>	<b>Sacarosa</b>	<i>Valor-P</i>	<b>Fructosa</b>	<i>Valor-P</i>
A: Variedad	<b>0,0003</b>	A: Variedad	<b>0,0012</b>	A: Variedad	<b>0,0014</b>
B: Ambiente	0,1299	B: Ambiente	0,1684	B: Ambiente	0,3486
C: Fecha	<b>0,0000</b>	C: Fecha	<b>0,0000</b>	C: Fecha	<b>0,0000</b>
Interacciones		Interacciones		Interacciones	
	AB 0,5325		AB 0,3328		AB 0,3977
	AC 0,1426		AC 0,8972		AC 0,2568
	BC 0,3600		BC 0,4983		BC 0,4551
	ABC 0,8423		ABC 0,6621		ABC 0,8423

Pero la interpretación agronómica de los resultados exige un análisis más profundo. La figura 11A muestra la evolución de la concentración de ácidos en los frutos de ‘M7’ y ‘Navelina’ muestreados en Córdoba y Huelva. De todos los ácidos analizados, solamente el ácido cítrico presenta diferencias claramente interpretables. De hecho, fue el único que mostró una correlación positiva y significativa con la acidez ( $r = 0,88$ ;  $P = 0,0001$ ) (Figura 12). La concentración de ácido cítrico en los frutos de la finca de Córdoba, independientemente de la variedad, fue significativamente y consistentemente inferior a la de los frutos de la finca de Huelva (Figura 11A), como ocurrió con la acidez (Figura 7). Es de destacar el orden de magnitud de este ácido respecto del resto. Su concentración fue 10 veces mayor que la del ácido málico, 100 veces mayor que la del ácido quínico, 1000 veces mayor que la de los ácidos succínico y maleico, y 10000 veces mayor que la del ácido fumárico (Figura 11A).



**Figura 11.** A: Niveles de ácidos tricarbóxicos en las fincas de Huelva y Córdoba para las variedades de Navelina y M7. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  ES. B: Relación metabólica de los ácidos tricarbóxicos con el ácido cítrico y almacenamiento vacuolar.



**Figura 12.** Regresión simple entre los ácidos tricarbóxicos y la acidez. A: cítrico (p=0.0001); B: málico (p=0.026); C: fumárico (p=0.204); D: succínico (p=0.78); E: maleico (p=0.36); F: quínico (p=0.0075).

El ácido cítrico se encuentra en la mitocondria, en las reacciones del ciclo de Krebs, en el citosol como precursor de numerosas reacciones y, mayoritariamente, en la

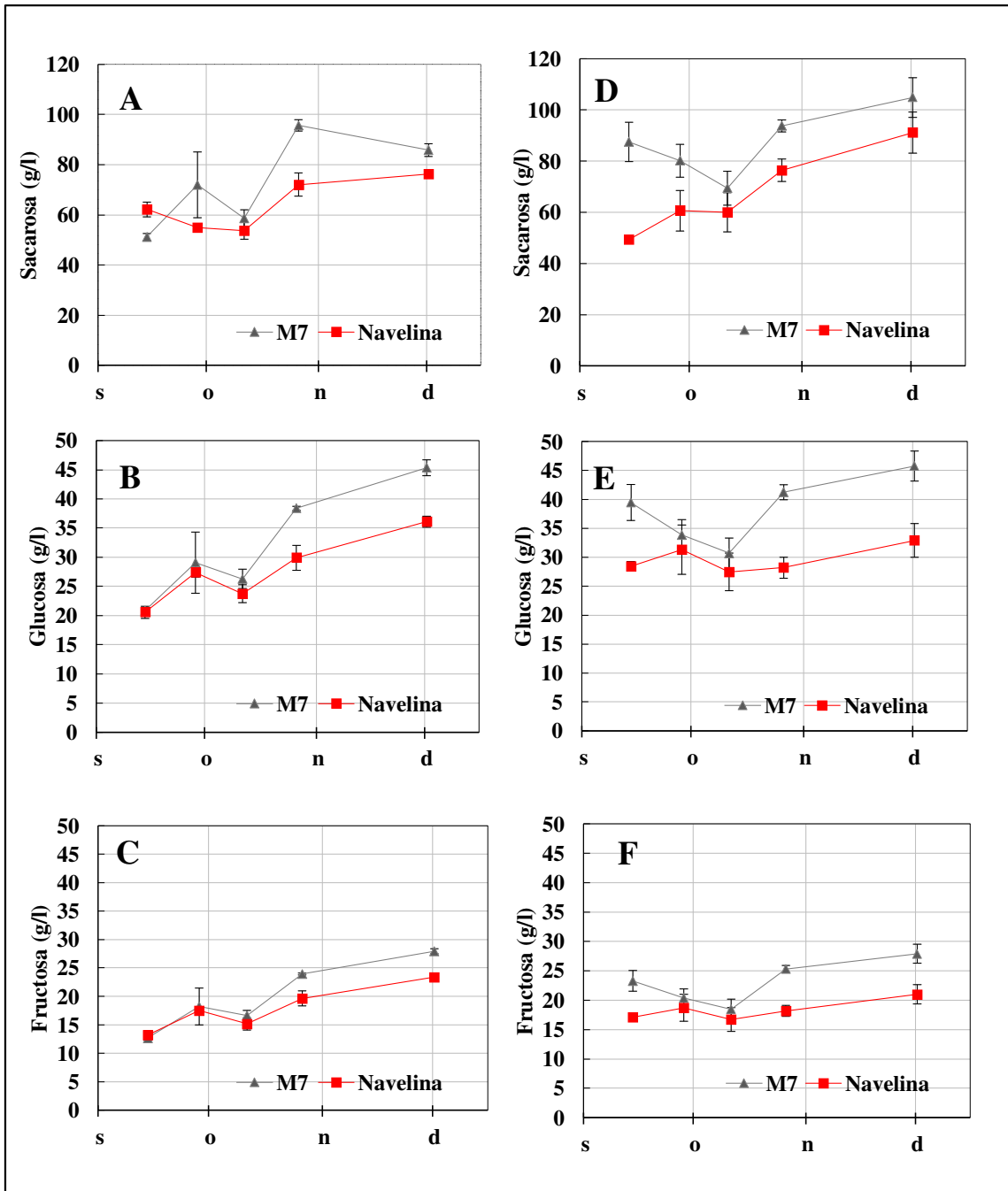
vacuola. El pH del citosol es prácticamente neutro, y los ácidos no se acumulan de un modo importante (Figura 11B; Degú et al., 2011). Sin embargo, la acumulación de ácido cítrico en la vacuola (pH ácido) es abundante y permite regular la acidez del fruto (Figura 11B; Guo et al., 2016). Ello explicaría la diferencia cuantitativa encontrada entre la concentración de ácido cítrico y el resto de ácidos, es decir, que la mayor parte del citrato analizado en el zumo sería el acumulado en la vacuola y no el del citosol o la mitocondria. La finca de Huelva muestra valores iniciales más elevados de ácido cítrico, probablemente debido a un mayor almacenamiento vacuolar. Las características del suelo (85% de arena) de esa finca, en comparación con la de Córdoba (5% de arena), podría haber influido en el estado hídrico de la planta (teniendo en cuenta la ausencia de lluvia de las 2 fincas). De este modo, como consecuencia del peor estado hídrico que se manifiesta en Huelva, los ácidos carboxílicos se acumulan en la vacuola por un proceso osmótico para evitar la pérdida de la turgencia (Sánchez, 2013).

De un modo similar, el malato (segundo en orden de magnitud) se relaciona con numerosas funciones metabólicas y fisiológicas, en varios orgánulos, como son el ciclo de Krebs (mitocondria), el ciclo del glioxilato (glioxisoma), regulador de la osmolaridad intracelular, amortiguador del pH citosólico (Martínez-Camacho et al., 2005). Los resultados indican una relación negativa con la acidez, lo cual sugiere que su concentración en el zumo está relacionada con otros procesos del metabolismo celular. El ácido quínico (tercero en orden de magnitud) mostró un descenso significativo con el tiempo en los frutos de las dos variedades cultivadas en las dos fincas (Figura 11A; Tabla 4), y, por ello, una correlación positiva y significativa con la acidez. Sin embargo, su función no es conocida con precisión (se ha relacionado con la síntesis de las hormonas ácido salicílico y metiljasmonato, respuesta frente a estrés oxidativo, estrés...), y es variable con la concentración (Clifford et al., 2017). Por ellos, a la vista de nuestros resultados, el ácido quínico no presenta funciones relacionadas con los parámetros agronómicos que determinan la maduración interna, dado que no mostró diferencias entre cultivares y fincas, pese a correlacionar con la acidez (Figura 12).

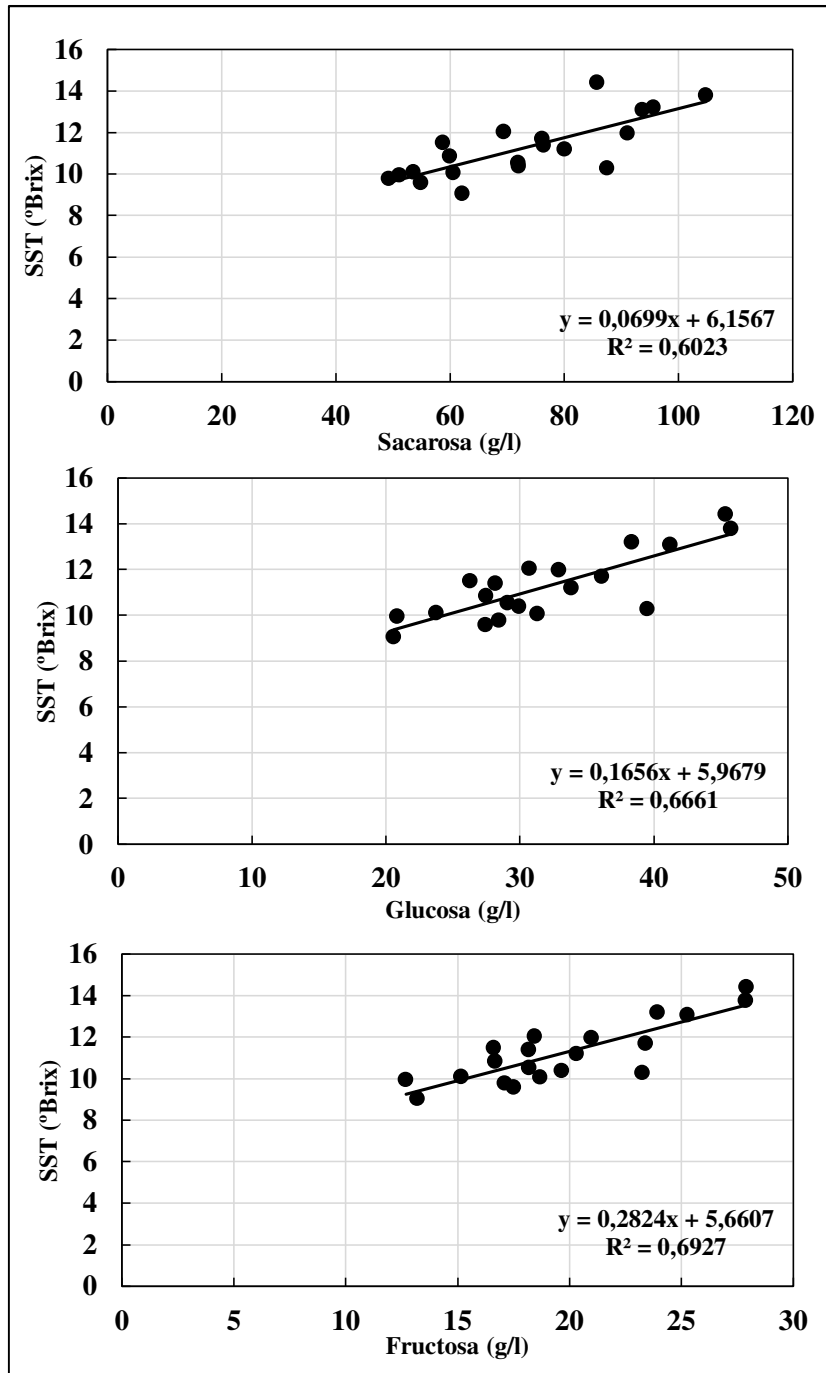
Finalmente, la escasa variación de los ácidos del ciclo de Krebs se relaciona con la continua conversión de unos en el proceso de respiración, por lo que la concentración determinada sería el resultado del estado de equilibrio entre las reacciones (Edwards et al., 1998).



La figura 12 muestra la evolución del contenido en sacarosa, glucosa y fructosa para las 2 variedades en las 2 fincas. En Córdoba, el contenido de carbohidratos en septiembre no muestra diferencias significativas, mientras que en Huelva los datos muestran un mayor contenido de sacarosa y hexosas en la variedad M7. La acumulación final de los tres metabolitos durante el mes de noviembre, en ambas parcelas, ha sido significativamente mayor en el caso de la variedad M7. Como no podía ser de otra manera, la correlación entre los 3 carbohidratos y los SST es significativa ( $P=0,0001$ ) y positiva ( $r=0,78$ ;  $r=0,81$ ;  $r=0,83$ ) para la sacarosa, glucosa y fructosa, respectivamente (Figura 13). Por tanto, la acumulación de sacarosa, glucosa y fructosa, y por ello de SST, en los frutos de M7 cultivados en las 5 fincas es un factor varietal ( $P=0.003$ ).



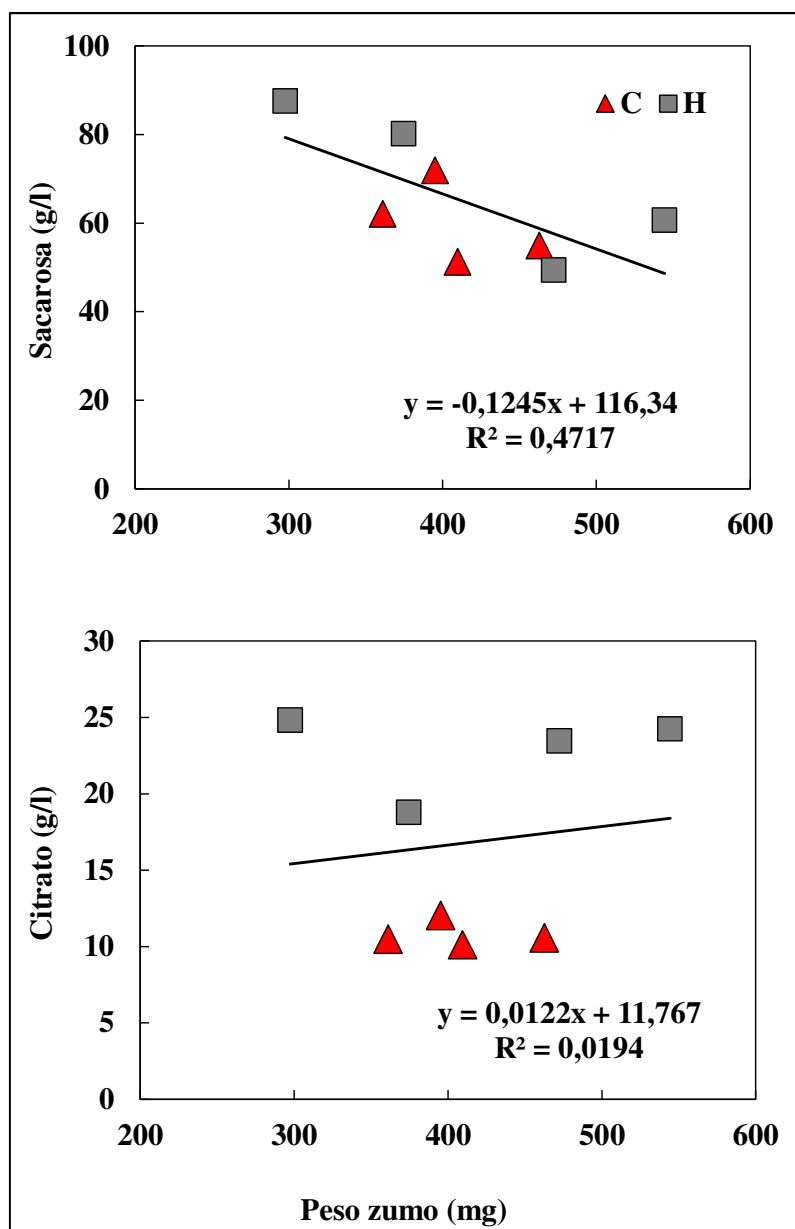
**Figura 13.** Evolución de la concentración de sacarosa, glucosa y fructosa en las fincas de Córdoba (A-C) Huelva (D-F) para las variedades de naranjo dulce 'Navelina' y 'M7'. Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas±ES.



**Figura 14.** Regresión simple entre los SST y los azúcares. A: sacarosa (p=0.00001); B: glucosa (p=0.00001); C: fructosa (p=0.0001).

Un aspecto destacable a la vista de los resultados obtenidos, es la diferencia significativa en la acidez (Figura 6) y concentración de ácido cítrico (Figura 9A) entre las fincas de Córdoba y Huelva ya en el mes de septiembre, cuando el fruto todavía se encontraba en el estado verde inmaduro ( $a = -14$ ). La menor concentración de ácido cítrico en Córdoba podría estar provocada por 3 motivos, efecto dilución, menor síntesis de citrato, mayor catabolismo de citrato.

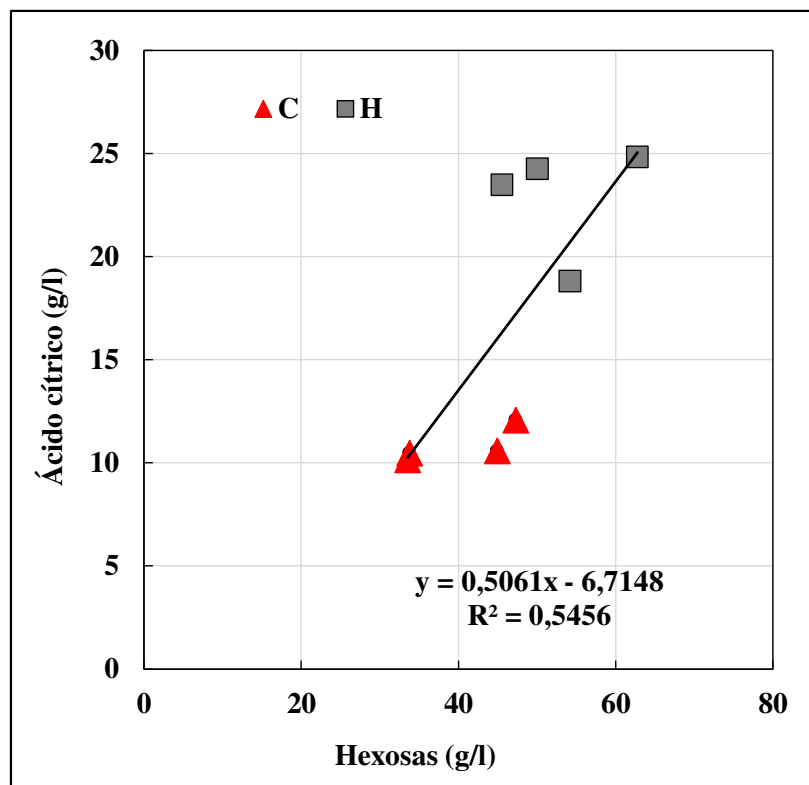
1. Efecto dilución. La concentración de ácidos y SST está condicionada por el aporte de agua, bien del riego, bien de la lluvia, de modo que cuando septiembre es lluvioso su concentración en el fruto maduro es menor (Agustí, 2004). Con el fin de determinar el efecto dilución debido al volumen de zumo acumulado en los frutos, se estudió la relación entre el peso del zumo y la concentración de ácido cítrico y carbohidratos (Figura 15). El estudio de regresión indica que la relación entre el peso del zumo y la concentración de ácido cítrico en el mes de septiembre no es significativa ( $P = 0,74$ ). Es interesante destacar la separación tan clara que se observa entre la nube de puntos de Córdoba y la nube de puntos de Huelva. Por tanto, las diferencias entre ellas serán por algún factor diferente al efecto dilución. En el caso de la relación peso del zumo-hexosas, el modelo se alejó de la significación ( $P = 0,60$ ), y con la sacarosa tampoco mostró significación estadística ( $P = 0,06$ ). Sin embargo, su proximidad a la significación estadística, y su elevado coeficiente de correlación ( $r = -0,68$ ), sugiere analizar este resultado con detalle para corroborar la ausencia de significación del efecto dilución. El aporte de agua en las 2 fincas fue el mismo, dado que 1) la lluvia fue nula en los 2 casos, y que 2) el volumen de riego fue similar y sin restricciones (las 2 fincas están gestionadas por los mismos técnicos, y tienen máxima disponibilidad hídrica). Pero la diferencia en la textura del suelo (arcilla en Córdoba, arena en Huelva) podría haber modificado el estado hídrico del árbol y la capacidad de acumulación de agua del fruto (Measham et al., 2014). Sin embargo, los pares de valores de Córdoba y Huelva se entremezclan en la misma nube de puntos (Figura 14), lo que permite descartar, también en este caso, el efecto dilución. Las diferencias deben ser, por tanto, por un efecto metabólico.



**Figura 15.** Estudio del efecto dilución. Correlación entre el peso de zumo del fruto y contenido en sacarosa (A;  $P = 0,06$ ) y citrato (B; ( $P = 0,74$ )) en el mes de septiembre. Los valores corresponden a los 2 muestreos del mes de septiembre en las fincas de Huelva y Córdoba para las variedades 'M7' y 'Navelina'.

- Menor síntesis de citrato. De los resultados no se puede deducir, directamente, diferencias en la síntesis de citrato al no haber estudiado la actividad enzimática. Sin embargo, se puede realizar una aproximación indirecta dada la relación entre los carbohidratos y los ácidos. El contenido en azúcares y ácidos aumenta durante la fase de crecimiento lineal (Iglesias et al., 2007). Los azúcares son el sustrato inicial para la obtención energía y poder reductor, por lo que una menor disponibilidad reduce la respiración (Sánchez, 2013). La figura 15 muestra una

relación positiva y significativa ( $p=0,0363$ ) entre el contenido en hexosas y el contenido en ácido cítrico para el mes de septiembre. Dada la separación observada entre los pares de puntos de las 2 fincas, y al haber descartado el efecto dilución (Figura 15), los resultados permiten especular una menor síntesis de citrato en Córdoba debido a un menor contenido en hexosas. Esta hipótesis requiere de nuevos estudios para su confirmación.



**Figura 15.** Relación entre el contenido en ácido cítrico y hexosas en las parcelas de Córdoba y Huelva. ( $p=0,0363$ )

3. Mayor catabolismo de citrato. De acuerdo a los estudios de Terrier et. al., 2001, un aumento de la temperatura implica un incremento en la actividad de las bombas de protones y una mayor degradación de ácidos en el citosol, para mantener el pH neutro, lo que conlleva una reducción de la acidez. Los estudios de Reuther (1973) establecieron que cuanto más alto es el régimen térmico día/noche, más baja es la concentración de ácidos en condiciones ambientales controladas. En condiciones de campo, Davies y Albrigo (1994) mostraron que en clima tropical húmedo

(Florida) la degradación de los ácidos es anterior y mayor que en clima Mediterráneo (California). Sin embargo, se desconoce el rango de temperaturas a partir del cual se reduce significativamente la acidez. Los resultados de la tabla 5 indican que, en el clima Mediterráneo, y para el naranjo dulce, ese rango estaría comprendido entre 28°C y 31°C, de modo que cuanto mayor es el número de días que se alcanza esa temperatura en el mes de septiembre (como ocurrió en Córdoba) menor es la acidez. Por debajo de 28°C, la relación no alcanza la significación estadística, mientras que por encima de 31°C se reduce progresivamente la significación y el coeficiente de correlación.

**Tabla 5.** Regresión múltiple entre la acidez del mes de septiembre y los factores 1) “número de días que la temperatura diaria alcanzó valores comprendidos entre 25 y 33°C” y 2) “variedad”. El factor variedad no alcanzó la significación estadística. Se realizó 1 análisis independiente para cada temperatura. Los valores de la acidez (n=9) corresponden a las muestras de frutos de los cvs. M7 (n=5) y Navelina (n=4) tomados en las 5 fincas (Huelva, Córdoba, Godelleta, Orihuela y Rafelguaraf). En la finca de Godelleta no se disponía del cultivar Navelina.

t <sup>a</sup> (°C)	valor p	r	Nº días parcela				
			H	C	G	O	R
25	0,2374	-0,5940	29	30	28	19	28
26	0,1698	-0,6536	29	30	26	19	28
27	0,0563	-0,7836	27	29	20	18	27
28	0,0080	-0,8496	24	29	14	13	25
29	0,0314	-0,8261	22	28	10	7	21
30	0,0067	-0,8989	15	27	8	5	15
31	0,0035	-0,9203	11	24	5	5	12
32	0,0116	-0,9203	8	22	5	4	8
33	0,0206	-0,8469	7	17	5	3	6
34	0,0218	-0,8773	5	14	2	3	5





## **CONCLUSIONES**



Las conclusiones del presente estudio son las siguientes:

1. La variedad M7 es más precoz que la variedad Navelina, pero su índice de madurez también depende del ambiente.
2. El contenido en sacarosa, glucosa y fructosa, y por tanto los SST, depende de la variedad, mientras que el contenido en ácido cítrico, y por tanto la acidez, depende del ambiente.
3. La acidez en el mes de septiembre correlaciona negativamente con el número de días en los que la temperatura es superior a los 28 °C.



## **BIBLIOGRAFÍA**



Albertini, M. V., Carcouet, E., Pailly, O., Gambotti, C., Luro, F., & Berti, L. (2006). Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8335-8339.

Alquézar B, Zacarías L, Rodrigo MJ: Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene  $\beta$ -cyclase from Citrus and its relation to lycopene accumulation. *J Exp Bot.* 2009, 60 (6): 1783-1797. 10.1093/jxb/erp048.

Alquezar, B., Rodrigo, M. J., & Zacarías, L. (2008). Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant Cara Cara. *Phytochemistry*, 69(10), 1997-2007.

Camacho, j. L. M., & salinas, j. V. C. La función y transporte del ácido l-málico en plantas: un dicarboxílico estrella. *Reb2005*, 39.

Cercós, M., Soler, G., Iglesias, D. J., Gadea, J., Forment, J., & Talón, M. (2006). Global analysis of gene expression during development and ripening of citrus fruit flesh. A proposed mechanism for citric acid utilization. *Plant molecular biology*, 62(4-5), 513-527.

Chen, M., Xie, X., Lin, Q., Chen, J., Grierson, D., Yin, X., ... & Chen, K. (2013). Differential expression of organic acid degradation-related genes during fruit development of Navel oranges (*Citrus sinensis*) in two habitats. *Plant molecular biology reporter*, 31(5), 1131-1140.

Clifford, M. N., Jaganath, I. B., Ludwig, I. A., & Crozier, A. (2017). Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Natural product reports*, 34(12), 1391-1421.

Degu, A., Hatew, B., Nunes-Nesi, A., Shlizerman, L., Zur, N., Katz, E., Fernie, A. R., Blumwald, E., and Sadka, A. 2011. Inhibition of aconitase in citrus fruit callus results in a metabolic shift towards amino acid biosynthesis. *Planta* 234:501–513.

Dennis, D., & Blakeley, S. (2000). Carbohydrate metabolism In: *Biochemistry & molecular biology of plants*. Ed. By BB Buchanans, W. Gruissem and RL Jones. American Society of Plant Physiologists, Rock Ville, Md., USA.

Edwards, S., Nguyen, BT, Do, B. y Roberts, JK (1998). Contribución de la enzima málica, piruvato quinasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa y el ciclo de Krebs a la respiración y la biosíntesis y a la regulación del pH intracelular durante la hipoxia en las puntas de raíz de maíz observadas mediante resonancia magnética nuclear y cromatografía de gases-espectrometría de masas. *Plant Physiology* , 116 (3), 1073-1081.

Guo, L. -X., Shi, C. -Y., Liu, X., Ning, D. -Y., Jing, L. -F., Yang, H., and Liu, Y. -Z. 2016. Citrate accumulation-related gene expression and/or enzyme activity analysis combined with metabolomics provide a novel insight for an orange mutant. *Sci. Rep.* 6: 29343.

Iglesias, D. J., Cercós, M., Colmenero-Flores, J. M., Naranjo, M. A., Ríos, G., Carrera, E., ... & Talon, M. (2007). Physiology of citrus fruiting. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(4), 333-362.

Katz E, Fon M, Lee YJ, Phinney BS, Sadka A, Blumwald E: The citrus fruit proteome: insights into citrus fruit metabolism. *Planta*. 2007, 226 (4): 989-1005. 10.1007/s00425-007-0545-8.

Liu Q, Xu J, Liu YZ, Zhao XL, Deng XX, Guo LL, Gu JQ: A novel bud mutation that confers abnormal patterns of lycopene accumulation in sweet orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *J Exp Bot*. 2007, 58 (15-16): 4161-4171. 10.1093/jxb/erm273.

Measham, PF, Wilson, SJ, Gracie, AJ, y Bound, SA (2014). Relaciones del agua del árbol: flujo y fruta. *Gestión del agua agrícola* , 137 , 59-67.

Richardson, A. C.; Marsh, K. B.; Macrae, E. A. Temperature effects on Satsuma mandarin fruit development. *J. Hort. Sci.* 1997, 72, 919–929.

Sadka A, Dahan E, Cohen L, Marsh KB: Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiol Plantarum*. 2000, 108 (3): 255-262. 10.1034/j.1399-3054.2000.108003255.x.

Sadka A, Dahan E, Or E, Cohen L: NADP(+)-isocitrate dehydrogenase gene expression and isozyme activity during citrus fruit development. *Plant Sci*. 2000, 158 (1-2): 173-181. 10.1016/S0168-9452(00)00328-9.



Shimada, T., Nakano, R., Shulaev, V., Sadka, A., & Blumwald, E. (2006). Vacuolar citrate/H<sup>+</sup> symporter of citrus juice cells. *Planta*, 224(2), 472-480.

Soule J, Grierson W: Anatomy and physiology. Fresh citrus fruits. Edited by: W. Wardowski, S. Nagy, and W. Grierson. 1986, AVI, Westport, Conn, 1-22.

Spiegel-Roy, P.; Goldschmidt, E. E. Reproductive physiology: flowering and fruiting. In *Biology of Citrus*; Cambridge University Press: Cambridge, 1996; pp 70–125

Terol, J., Soler, G., Talon, M., & Cercos, M. (2010). The aconitate hydratase family from Citrus. *BMC plant biology*, 10(1), 222.

Tucker, G. A. *Introduction*. In *Biochemistry of fruit ripening*; Seymour, G., Taylor, J., Tucker, G., Eds.; Chapman and Hall: London, 1993; pp 1-37.